

Die transepitheliale Potenzialdifferenzmessung: Ansätze zur Realisierung einer  
breiteren Anwendung

Inauguraldissertation  
zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin  
des Fachbereichs Medizin  
der Justus-Liebig-Universität Gießen

vorgelegt von Katrin Christina Weber  
aus Wiesbaden

Gießen 2005

Aus dem Medizinischen Zentrum für Kinderheilkunde und Jugendmedizin  
Funktionsbereich Pädiatrische Pneumologie und Allergologie  
Leiter: Prof. Dr. Lindemann  
des Universitätsklinikums Gießen

Gutachter: Prof. Dr. H. Lindemann  
Gutachter: PD Dr. A. Scholz

Tag der Disputation: 15.09.2005

Meiner Schwester Rike und Gerhard, stellvertretend für alle Mukoviszidose-Patienten, gewidmet.

Ich erkläre: Ich habe die vorgelegte Dissertation selbstständig, ohne unerlaubte fremde Hilfe und nur mit den Hilfen angefertigt, die ich in der Dissertation angegeben habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nicht veröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt ist, eingehalten.

# Inhaltsverzeichnis:

<b>1</b>	<b>Einleitung</b>	<b>7</b>
<b>1.1</b>	<b>Allgemeines</b>	<b>7</b>
<b>1.2</b>	<b>Ionentransportstörung am respiratorischen Epithel der Mukoviszidose</b>	<b>9</b>
<b>1.3</b>	<b>Klinischer Verlauf, Therapieprinzipien und Prognose</b>	<b>12</b>
<b>1.4</b>	<b>Die transepitheliale Potenzialdifferenz (PD) und andere elektrophysiologische Methoden</b>	<b>13</b>
<b>1.5</b>	<b>Zielsetzung</b>	<b>15</b>
<b>2</b>	<b>Methodik</b>	<b>16</b>
<b>2.1</b>	<b>Pathophysiologische Grundlagen der Potenzialdifferenzmessung</b>	<b>16</b>
<b>2.2</b>	<b>Blockade des Natriumeinstroms durch Amilorid</b>	<b>17</b>
<b>2.3</b>	<b>Chlorionensekretion über CFTR-abhängige Kanäle</b>	<b>18</b>
<b>2.4</b>	<b>Material und Gerätebeschreibung zur transepithelialen Potenzialdifferenzmessung</b>	<b>20</b>
<b>2.5</b>	<b>Versuchsaufbau zur Messung der transepithelialen Potenzialdifferenz</b>	<b>21</b>
<b>2.6</b>	<b>Messvorgang bei der transepithelialen Potenzialdifferenzmessung am Epithel der Nasalschleimhaut</b>	<b>22</b>
<b>2.7</b>	<b>Versuchsaufbau der nasalen transepithelialen Potenzialdifferenzmessung mit Superfusion verschiedener Lösungen</b>	<b>24</b>
<b>2.8</b>	<b>Zusammensetzung der verschiedenen Lösungen</b>	<b>26</b>

2.9	Messvorgang der transepithelialen Potenzialdifferenzmessung mit Superfusion verschiedener Lösungen	27
2.10	Die transepitheliale Potenzialdifferenzmessung mittels Superfusion bei Säuglingen und Kleinkindern	30
2.11	Messung der transepithelialen Potenzialdifferenz an der Rektalschleimhaut	31
2. 11	Verwendung von direkt konnektierbaren Elektroden bei der Potenzialdifferenzmessung am Menschen	33
2.12	Untersuchungen zum Einfluss verschiedener Flussgeschwindigkeiten bei der Superfusion auf die transepitheliale Potenzialdifferenz	35
2.13	Direktvergleich der nasalen und der rektalen Potenzialdifferenzmessung in vivo	37
2.14	Probanden- und Patientenkollektive	39
2.15.1	Vergleich von direkt konnektierbaren und konventionellen Elektroden	39
2.15.2	Vergleich verschiedener Flussstärken	39
2.15.3	Vergleich von nasaler und rektaler PD	39
2.16	Statistische Methoden	40
3	Ergebnisse	41
3.1	Vergleich von direkt konnektierbaren Elektroden mit der konventionellen Methode bei der Potenzialdifferenzmessung	41
3.2	Vergleich der Wirkung verschiedener Flussstärken- und konzentrationen der Superfusionslösungen auf die nasale transepitheliale Potenzialdifferenz	45
3.3	Vergleich von rektaler und nasaler Potenzialdifferenzmessung in vivo	56

<b>4</b>	<b>Diskussion</b>	<b>65</b>
<b>4.1</b>	<b>Allgemeines zur Potenzialdifferenzmessung (PD)</b>	<b>65</b>
<b>4.2</b>	<b>Vergleich von direkt konnektierbaren Elektroden mit der konventionellen Methode bei der PD-Messung am Menschen</b>	<b>66</b>
<b>4.3</b>	<b>Vergleich der Wirkungen verschiedener Flusstärken- und konzentrationen der Superfusionslösungen auf die nasale transepitheliale Potenzialdifferenz</b>	<b>68</b>
<b>4.4</b>	<b>Direktvergleich der nasalen und der rektalen PD-Messung</b>	<b>69</b>
<b>5</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>72</b>
<b>6</b>	<b>Summary</b>	<b>75</b>
<b>7</b>	<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>77</b>
<b>8</b>	<b>Danksagung</b>	<b>91</b>
<b>9</b>	<b>Lebenslauf</b>	<b>92</b>

# 1 Einleitung

## 1.1 Allgemeines

Die Mukoviszidose, auch Cystische Fibrose (CF) genannt, ist mit einer Prävalenz von 1:3000 die häufigste angeborenen Stoffwechselerkrankung der weißen Bevölkerung in Mitteleuropa und den USA [1,2]. Die Erkrankung wird autosomal rezessiv vererbt. Man schätzt die Anzahl der heterozygoten Merkmalsträger, die keine Symptome aufweisen, auf ca. 5% [3].

Das CF Gen, das im Jahre 1989 kloniert wurde, ist auf dem langen Arm des Chromosoms 7 im Bereich 7q3.1 lokalisiert und besteht aus 27 Exons. Es kodiert ein Protein von 1480 Aminosäuren, das den Namen „Cystic fibrosis transmembrane regulator“ (CFTR) erhielt. Bei der häufigsten Mutation, delta F508, die in Europa bei etwa 75-80% der CF-Patienten vorliegt, fehlen 3 Nukleotide, die für Phenylalanin an der Position 508 des Proteins kodieren [2,4,5,6]. Weitere relativ häufige Mutationen sind R553X, N1303K, G542X, G551D und R347P. Darüber hinaus wurden inzwischen mehr als 1350 verschiedene Mutationen identifiziert, und diese Zahl nimmt ständig zu [7].

Je nach Gendefekt kommt es an verschiedenen Stellen zu Störungen der Proteinsynthese. Deshalb teilt man die CF-Mutationen inzwischen in 6 Defektklassen ein (Abb.1.1) [7,8,9].

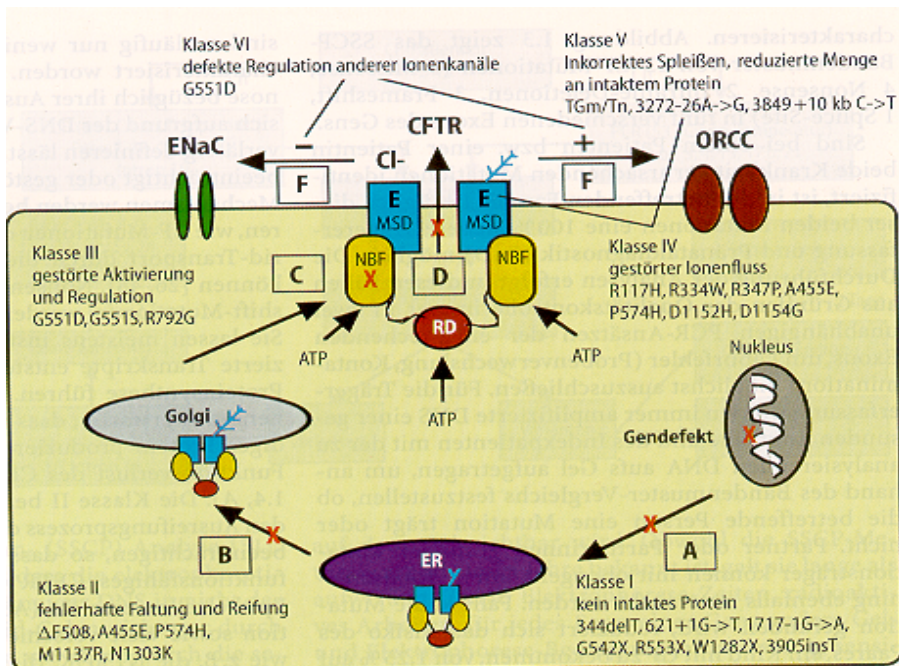


Abb.1.1 Darstellung der unterschiedlichen Defektklassen bei Mukoviszidose [10]

Der Klasse I werden die Mutationen zugeordnet, bei denen kein intaktes Protein vorliegt, z.B. R553X oder G542X. Zur Klasse II zählt man die in Europa mit Abstand häufigste Mutation delta F508. Hier kommt es zu einer fehlerhaften Faltung und Reifung des Proteins. Defekte der Klasse III weisen eine gestörte Regulation und Aktivierung des CFTR-Komplexes auf; dieser Gruppe ist beispielsweise die Mutation G551D zugeordnet. Gruppe IV weist eine gestörte Ionenleitfähigkeit des CFTR-Kanals auf; Beispiele hierfür sind R117H oder R347P. Die Störung bei Klasse V liegt in einem inkorrekten Splicing, das für eine deutlich reduzierte Menge an intaktem Protein verantwortlich ist. Klasse VI weist eine defekte Regulation anderer Ionenkanäle auf.

Je nach Mutationsklasse kommt es zu unterschiedlich schweren Verlaufsformen der Mukoviszidose, wobei allerdings bei derselben Mutation eine erhebliche Varianz in der Ausprägung bestehen kann [11,12].



Folge des defekten CFTR-Proteins ist eine Permeabilitätsstörung von Epithelzellen vieler Organe für Chlorionen wie auch für andere Anionen [13,14]. In den Ausführungsgängen der Schweißdrüsen von CF-Patienten kann im Gegensatz zu Gesunden kaum NaCl rückresorbiert werden, was zu einem wesentlich höheren Verlust an Natrium und Chlorid über den Schweiß führt [15,16,17,18,19].

Diese hohe NaCl-Konzentration im Schweiß kann man mit Hilfe der Pilocarpin-Iontophorese messen, grenzwertige Ergebnisse sind aber nicht selten [20,21,22].

Zum Repertoire der CF-Diagnostik gehört seit einiger Zeit auch die Potenzialdifferenzmessung an der Nasal- bzw. Rektalschleimhaut mittels Superfusion [23]. Diese Messmethode ist Gegenstand der vorliegenden Arbeit.

## **1.2 Ionentransportstörung am respiratorischen Epithel bei Mukoviszidose**

Der Ionentransport durch die Zelle ist für die Zusammensetzung des Bronchialsekretes von großer Bedeutung. Er erfolgt über unterschiedliche Transportsysteme.

Bei der Mukoviszidose kommt es zu einer Ionentransportstörung, von der insbesondere die Chlorid- und Natriumkanäle betroffen sind (Abb.1.2) [24].

Natriumionen werden aufgrund eines elektrochemischen Gradienten an der luminalen Seite der Mukosazelle aufgenommen und an der basolateralen Membran mit Hilfe der Na-K-ATPase gegen Kalium ausgetauscht [24,25,26].

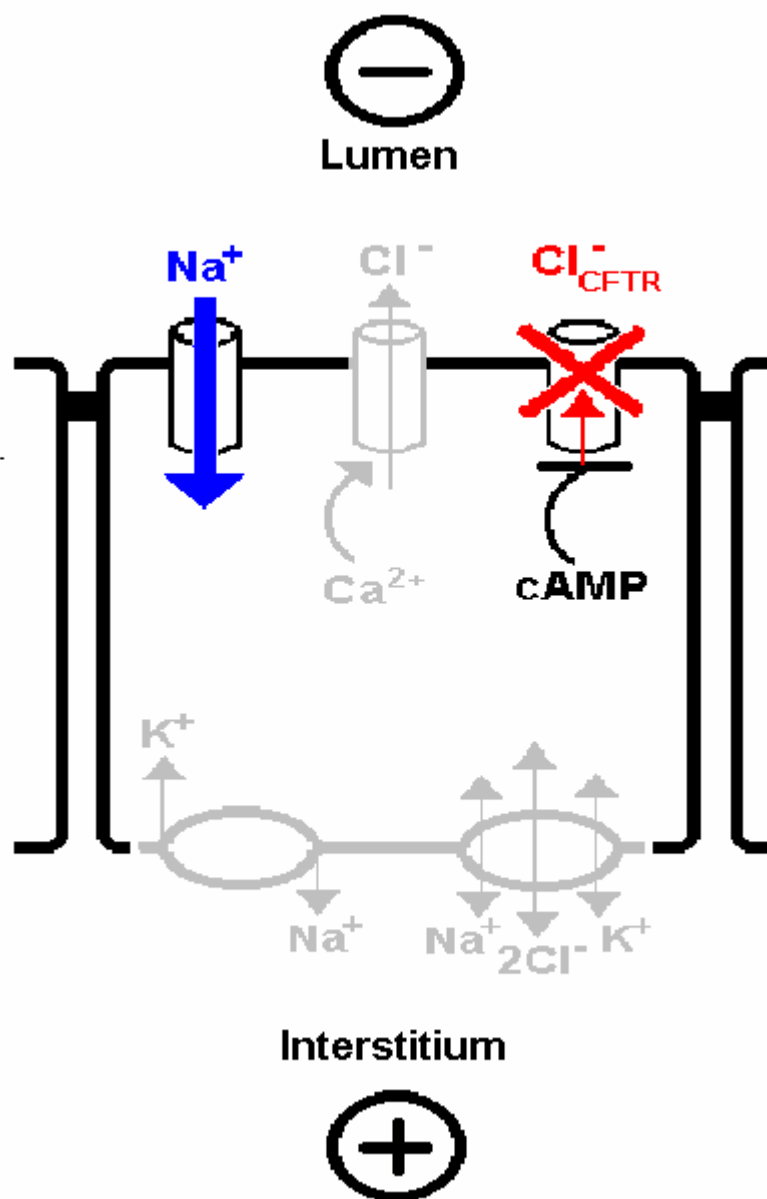
Der Chloridtransport an der apikalen Membran erfolgt über einen cAMP-regulierten Chloridkanal, der dem Glykoprotein des CFTR-Gens entspricht [27,28,29,30].

Ein zweiter „alternativer“ Weg läuft über die Aktivierung der Kalzium-abhängigen Proteinkinase mittels Kalzium [25,26]. Weiterhin gibt es

parazelluläre Transportvorgänge, die zum Teil noch strittig sind und nicht näher erläutert werden sollen [18,24,31,32].

Der bei der Mukoviszidose gestörte transepitheliale Natrium- und Chloridtransport wirkt sich verhängnisvoll aus: An der luminalen Membran resultiert eine gestörte Chloridsekretion und konsekutiv eine exzessiv gesteigerte Absorption von Natrium und Wasser. Dies führt wiederum zu einer Viskositätszunahme und Veränderung der Elektrolytkonzentration der Sekrete [13,18,24,25,32,33,34,35,36].

Betroffen sind bei der Mukoviszidose die Chloridkanäle, die per Phosphorylierung der cAMP Moleküle gesteuert werden. Die sogenannten alternativen Kanäle sind bei CF-Patienten wie bei Gesunden voll funktionstüchtig. Sie können einen geringen Teil der defekten Chloridsekretion kompensieren, eine vollständige Kompensation ist nach derzeitigem Kenntnisstand nicht möglich ( Abb.1.2) [27,37].



1.2 Darstellung der transepithelialen Ionentransportstörung bei Mukoviszidose. Erläuterungen im Text.

### **1.3 Klinischer Verlauf, Therapieprinzipien und Prognose**

Klinisch führt die beschriebene Ionentransportstörung und daraus resultierende Viskositätszunahme der Sekrete zu einer Funktionsstörung vor allem von Lunge und Pankreas. Durch das zähe Sekret werden die Ausführungsgänge des Pankreas obturiert, die Drüse zerstört und es resultiert eine exokrine Pankreasinsuffizienz.

Im Respirationstrakt kommt es zu einer Sekretretention, die mukoziliäre Clearance ist deutlich herabgesetzt. Die Folge ist eine Kolonisation mit Krankheitserregern wie *Staphylokokkus aureus*, *Haemophilus influenzae*, *Pseudomonas aeruginosa* und Problemkeimen wie *Burkholderia cepacia* [7]. Rezidivierende Infektionen verursachen erhebliche Schädigungen des Lungengewebes, es kommt zu fibrosierenden und atelektatischen Bezirken sowie Bronchiektasen. Im Spätstadium entwickelt sich eine respiratorische Insuffizienz mit allen Begleiterscheinungen [7,38].

Eine kausale Therapie der bronchopulmonalen Manifestation der Mukoviszidose steht bislang nicht zur Verfügung. Grundpfeiler des aktuell durchgeführten Therapie-Regimes sind die Sekretelimination mittels Krankengymnastik und eine konsequent durchzuführende Inhalationstherapie. Atemwegsinfektionen sollten möglichst frühzeitig gezielt antibiotisch behandelt werden [7].

Viele CF Patienten leiden zudem unter einer bronchialen Hyperreagibilität, der ein Asthma bronchiale, eine allergische bronchopulmonale Aspergillose oder eine Atemwegsinfektion zu Grunde liegen kann. Neben den inhalativen Glukokortikoiden haben sich zur antiobstruktiven Therapie Bronchodilatoren bewährt, hierbei sind auch Anticholinergika gut geeignet. Das langwirksame Anticholinergikum Tiotropiumbromid (Spiriva), das neuerdings als Pulverinhalation zur Verfügung steht, aktiviert bei CF- Patienten die eventuell vorhandene Restfunktion der Chloridkanäle langfristig, ohne dass das Risiko einer Toleranzentwicklung besteht [39].

Neben der Therapie der bronchopulmonalen Manifestation ist weiterhin auf eine ausreichende Kalorien- und Vitaminzufuhr zu achten. Bei bestehender Pankreasinsuffizienz ist eine angemessene Enzymsubstitution erforderlich [7]. Die Prognose für CF-Patienten hat sich in den letzten Jahren erheblich verbessert. So kann man davon ausgehen, dass ein heute geborener Patient inzwischen eine mittlere Lebenserwartung von 40-50 Jahren hat. Gründe hierfür sind vor allem die verbesserte antibiotische Behandlung, die intensiviertere individuelle Inhalations- und Physiotherapie sowie die optimierte Enzymsubstitution mit säurefesten Präparaten (7). Ein wichtiger Aspekt ist ein umfassendes Versorgungskonzept, das eine intensive Betreuung der Patienten beinhaltet [7,38,40]. Voraussetzung dafür ist ein Team aus kompetenten Ärzten, Pflegepersonal, Ernährungsberatern bzw. Ökotrophologen, Physio- und Familientherapeuten sowie eine gute psychosoziale Betreuung.

#### **1.4 Die transepitheliale Potenzialdifferenz (PD) und weitere elektrophysiologische Methoden**

Wie bereits erwähnt erfolgt die Regulation des Flüssigkeitshaushaltes am respiratorischen Epithel (wie auch an anderen Epithelien) über aktive und passive Ionentransportsysteme. Durch diese Ionentransportvorgänge entsteht eine messbare Spannung, die sogenannte transepitheliale Potenzialdifferenz. Sie wird in Millivolt (mV) gemessen und ist in Bezug auf die Submukosa lumen negativ (vgl Abb.1.2) [23,32,41,42,43].

Die Potenzialdifferenz kann in vivo am besten am respiratorischen Epithel der Nase unterhalb der Concha nasalis inferior gemessen werden. Die Basalwerte der nasalen Potenzialdifferenz liegen bei CF-Patienten meist höher als bei Gesunden [44,45], weisen jedoch eine große Variabilität auf, so dass der Überlappungsbereich beträchtlich ist und diagnostische Unsicherheiten bleiben.

Die Aktivierung über die cAMP-gesteuerte Signalübermittlung führt bei Gesunden nach Natriumkanalblockade zur Stimulation der Chlorid-Sekretion und damit zur Zunahme der Lumen-negativen Potentialdifferenz. Bei CF-Patienten bleibt dieser Effekt typischerweise aus (siehe Abb.2.7). Damit erschließt sich der Zugang zu einer präziseren Information über eine eventuell bestehende Ionentransportstörung, als sie mit der Messung der basalen PD möglich ist.

In analoger Weise werden am intestinalen Epithel der Rektumschleimhaut in vitro Messungen in einer modifizierten Ussing-Kammer durchgeführt [46]. Neben der transepithelialen Potenzialdifferenz kann dabei der transepitheliale Widerstand gemessen, und daraus der sog. Äquivalente Kurzschlussstrom ermittelt werden. Die Entnahme von oberflächlichen, etwa 2 - 3 mm großen Rektumschleimhautbiopsien erfolgt rektoskopisch aus intakter Mukosa. Die Untersuchung kann problemlos in jeder Altersklasse, auch im Säuglings- und frühen Kindesalter, ggf. unter Sedierung, durchgeführt werden. Die Entnahme des Biopsates ist nicht schmerzhaft, da das Rektum nicht mit Schmerzfasern innerviert wird [47].

Aktuelle Daten legen nahe, dass mit diesen Methoden für die Erfassung der charakteristischen Ionentransportstörung bei CF, in Abhängigkeit von den Messbedingungen und dem gewählten Protokoll, eine annähernd hundertprozentige Sensitivität und Spezifität erreicht werden kann [23,48].

Die Indikation zu diesen weiterführenden elektrophysiologischen Untersuchungen ergibt sich, wenn die Diagnose bei klinischem Verdacht auf eine CF nach gebräuchlicher Diagnostik nicht eindeutig bestätigt oder verworfen werden kann. Da es sich sowohl bei der nasalen Potentialdifferenzmessung als auch bei der Kurzschlussstrommessung in Rektumschleimhautbiopsien um technisch und personell aufwändige Untersuchungen handelt, werden diese nur an wenigen entsprechend ausgestatteten Zentren durchgeführt.

## **1.5 Zielsetzung**

Ziel der vorliegenden Doktorarbeit war die Vereinfachung und Ergänzung der Methodik zur Bestimmung der transepithelialen Potenzialdifferenz. Die Untersuchungen wurden von der Ethikkommission der Justus-Liebig-Universität genehmigt.

1) Der aktuelle Versuchsaufbau zur Messung der transepithelialen Potenzialdifferenzmessung bedient sich eines kompliziert aufgebauten Systems aus Agarbrücken. Die Frage war, ob sich dieses System durch einen modifizierten Versuchsaufbau vereinfachen lässt.

2) Ferner sollte untersucht werden, inwieweit die Flussgeschwindigkeiten- und -konzentrationen der Lösungen die Aussagekraft der PD-Messung beeinflussen. Daraus sollten Konsequenzen für das künftige Vorgehen gezogen werden.

3) Zur Zeit kann die Potenzialdifferenzmessung entweder in vivo an der Nasen- oder in vitro an der Rektumschleimhaut durchgeführt werden. Verlässliche Messungen in vivo an der Rektumschleimhaut sind bislang noch nicht bekannt. Die rektale in vivo Messung sollte durch Vergleichsmessungen an Nasen- und Rektumschleimhaut validiert werden.

## 2 Methodik

### 2.1 Pathophysiologische Grundlagen der Potenzialdifferenzmessung

Wie erwähnt entsteht die Spannung, die bei der transepithelialen Potenzialdifferenzmessung (PD) gemessen werden kann, durch aktive und passive Ionentransportvorgänge.

Von mehreren Arbeitsgruppen konnte gezeigt werden, dass die Submukosa des respiratorischen Epithels isoelektrisch zur Subcutis ist [49,50]. Daraus ergibt sich die Möglichkeit, die Referenz der transepithelialen Potenzialdifferenz von einer beliebigen, gut erreichbaren Stelle des Körpers abzuleiten.

Knowles et al. führten die ersten in-vivo-Messungen am respiratorischen Epithel des Menschen durch und fanden heraus, dass sich am Flimmerepithel von Mukoviszidose-Patienten deutlich höhere PD-Werte messen ließen als am Flimmerepithel gesunder Probanden [44,51].

Verantwortlich hierfür ist die exzessiv gesteigerte Natrium-Absorption bei Mukoviszidose Patienten, die aufgrund der gestörten Chloridsekretion entsteht und mit der PD korreliert [51] (vgl. Abb.1.1). Folge ist ein höherer Verlust positiver Valenzen auf der luminalen Seite und somit eine Vergrößerung der PD im Vergleich zu gesunden Probanden.

Die Potenzialdifferenz beträgt bei Mukoviszidose-Patienten häufig mehr als  $-60$  mV, während sie bei gesunden Probanden selten größer als  $-40$  mV ist.

Dementsprechend kann die Ionentransportstörung, und die sich daraus ergebende erhöhte Potenzialdifferenz als diagnostisches Mittel zur Unterscheidung zwischen CF- und Nicht-CF Patienten genutzt werden.

Durch verschiedene Medikamente kann man die Potenzialdifferenz an verschiedenen Ionenkanälen unterschiedlich beeinflussen.



## **2.2 Blockade des Natriumeinstroms durch Amilorid**

Amilorid ist als kaliumsparendes Diuretikum bekannt. Es hemmt schnell und reversibel die Na-Absorption am distalen Tubulus der Niere. Die genaue Bindungsstelle und der Inhibitionsmechanismus sind noch nicht vollständig geklärt. Wegen seiner schwachen diuretischen Wirkung und des kaliumsparenden Effekts wird Amilorid nur in Kombinationspräparaten eingesetzt.

Auch am respiratorischen oder intestinalen Epithel ist Amilorid in der Lage, Na-Kanäle zu blockieren (Abb 2.1). Es kann nasal, inhalativ oder rektal appliziert werden [52,53,54,55,56,57].

Durch das Verbleiben der Na-Ionen auf der luminalen Seite des Epithels kommt es dort zu einer Erhöhung der positiven Ladung und zu einer Verringerung der PD [58,59]. Das Absinken der PD nach Applikation von Amilorid ist in der Regel bei CF-Patienten stärker ausgeprägt als bei gesunden Probanden und somit ebenfalls diagnostisch zu verwenden.

Von einigen Arbeitsgruppen wird Amilorid daher präventiv eingesetzt [60,61,62]. Durch die Blockade des Natriumkanals steigt die Natriumkonzentration und somit auch der Wassergehalt im Lumen. Das Sekret wird flüssiger und kann von den Patienten besser abgehustet werden [62].

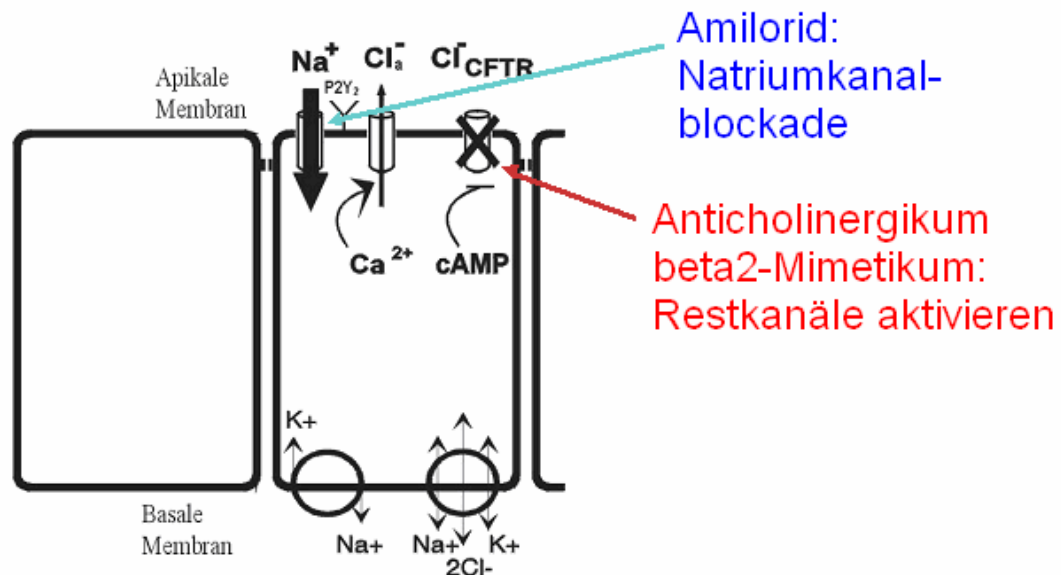


Abb. 2.1 Ansätze zur medikamentösen Beeinflussung der Potenzialdifferenz

### 2.3 Chlorionensekretion über CFTR-abhängige Kanäle

Bei gesunden Probanden lässt sich über eine Aktivierung der Adenylatzyklase und des zyklischen Adenosinmonophosphats die Chlorionensekretion am CFTR-Kanal durch Gabe eines  $\beta$ -Sympathomimetikums stimulieren [24,29,63]. Chlorionen werden nach Stimulation mit Salbutamol u.a. vermehrt sezerniert, was zu einer Erhöhung der PD-Werte führt [64,65]. Bei CF-Patienten lässt sich die Chlorionenpermeabilität am CFTR-Kanal als Folge des CFTR-Defektes nicht verbessern, dementsprechend kommt es nach Applikation eines  $\beta$ -Sympathomimetikums nicht zum Anstieg der PD (vgl. Abb.2.5).

Der Chloridkanalstimulationstest dient bei Grenzfällen als wichtiges diagnostisches Mittel zur Unterscheidung zwischen CF- und Nicht CF- Patienten [ 66,67].

Neben den CFTR-abhängigen Chlorionenkanälen existieren noch kalzium-abhängige, „alternative“ Chlorionenkanäle, die im Rahmen der elektrophysiologischen Diagnostik ebenfalls geprüft werden, z.B. mittels chloridfreier Lösung [64].

## **2.4 Material und Gerätebeschreibung zur transepithelialen Potenzial-differenzmessung**

Benötigtes Zubehör:

- Millivoltmeter der Wissenschaftlichen-Technischen Werkstätten GmbH, WTW PH 530, Weilheim
- 2 Silberchloridelektroden: Standardbezugselektrode Typ 373 von Ingold GmbH PH-Messtechnik, Steinbach im Taunus
- Kaltlichtquelle der Firma Karl Storz., halogen 150, 20112120
- 5 Infusionspumpen, Typ Injektomat der Firma Fresenius
- 50ml Injektomat Pumpen
- Injektomat-Leitungssysteme
- Drei-Wege-Hähne
- Venenverweilkanüle, Typ Surflo24G
- Nabelarterienkatheter, Typ Argyle 3.5 Ch
- 2 Agargelbrücken in Plastikschläuchen, gefüllt mit isotonischer Kochsalzlösung in Bactoagar der Firma Difco, Augsburg
- 2 Agargelbrücken in U-förmigen Glasröhrchen gefüllt mit 3-molarer KCl-Lösung in Bactoagar der Firma Difco, Augsburg
- 2 Erlenmeyerkolben 200ml mit 3-molarer KCL-Lösung gefüllt, passende Stopfen mit Bohrungen
- Pflaster zur Fixierung der Venenverweilkanüle
- Handschuhe
- Nasenspekulum mit Fiberglas-Lichtträger
- PC Microscan zur Aufzeichnung der Messkurve

*(aus Dissertation A. Ziersch, Optimierung der Mukoviszidose-Diagnostik und Überprüfung neuer Therapieansätze auf der Basis der nasalen Potenzial-differenzmessung, Giessen 1999)*

## 2.5 Versuchsaufbau zur Messung der transepithelialen Potenzialdifferenz

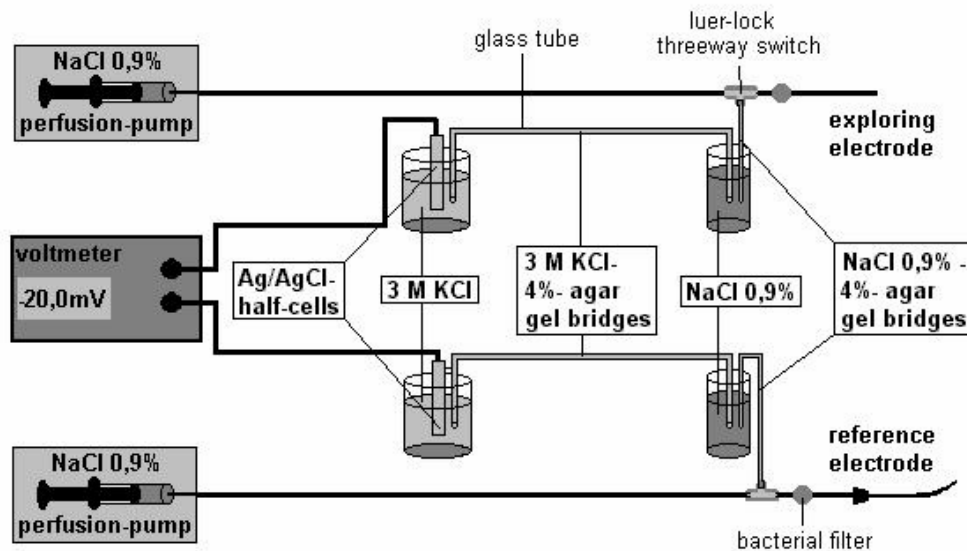


Abb. 2.2 Versuchsaufbau der transepithelialen Potenzialdifferenzmessung ( $M$ =molar). Erläuterungen im Text.

Das Voltmeter wird mit zwei Silberchloridelektroden verschaltet (Abb. 2.2). Diese münden in ein mit 3-molarer Kaliumchloridlösung gefülltes Gefäß. Ebenfalls in diesem Gefäß befindet sich ein U-förmiges Glasröhrchen, gefüllt mit einem Agargel aus 3-molarer Kaliumchloridlösung, dessen anderer Schenkel in einem weiteren Gefäß mündet, das mit isotoner Kochsalzlösung gefüllt ist. Von diesem zweiten Gefäß führt wiederum ein mit Natriumchlorid befüllter Agar zu einem Seitenanschluss eines Dreiwegehahns, der über ein Flusssystem einerseits mit der Perfusionspumpe, andererseits mit der

Referenzelektrode bzw. mit der Messelektrode verbunden ist. In dem Flusssystem wird über die Perfusionspumpen isotonische Natriumchloridlösung üblicherweise mit einer Geschwindigkeit von 7 ml/h auf der Messseite bzw. 3.5 ml/h auf Seiten der Referenz gefördert [68,69,70].

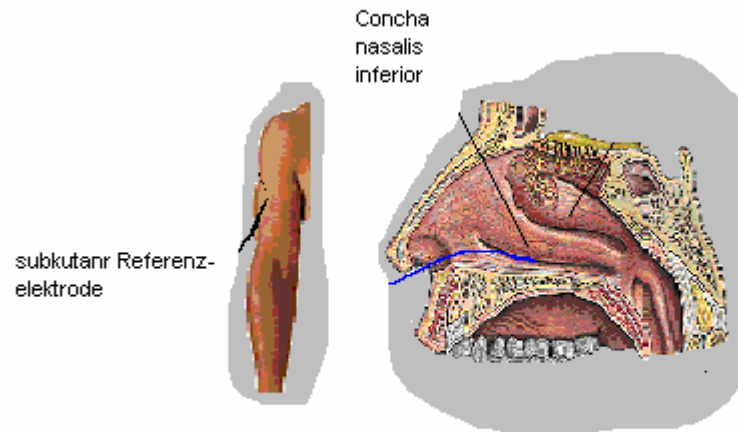
Als Messelektrode dient ein Nabelarterienkatheter, der mit den Gelbrücken über ein Infusionssystem verbunden ist, als Referenzelektrode eine Venenverweilkanüle, die subkutan in den Oberarm des Patienten platziert wird (Abb. 2.3 links).

## **2.6 Messvorgang bei der transepithelialen Potenzialdifferenzmessung am Epithel der Nasalschleimhaut**

Vor dem eigentlichen Messvorgang werden die Dreiwegehähne so geschaltet, dass die Mess- bzw. Referenzelektrode einerseits über das Infusionssystem mit den Perfusionspumpen, die isotone Kochsalzlösung fördern, andererseits mit den Agargelbrücken verbunden sind. Luftblasen in den Infusionsleitungen müssen vermieden werden, da sie die Messung beeinträchtigen.

Zur Kontrolle des korrekten Messaufbaus und der Funktion der Gelbrücken wird vor jeder Messung ein Nullabgleich durchgeführt: Man hält die Enden der Referenz- und Messelektrode gegeneinander und erzeugt so einen Kurzschluss. Bei korrektem Versuchsaufbau und einer funktionstüchtigen Gelbrücke ist unter diesen Bedingungen keine Spannung zu messen. Spannungsschwankungen von  $-1$  bis  $+1$  mV werden toleriert [49,68,69,70].

Zur Aufzeichnung der Messkurve ist das Millivoltmeter mit einem PC direkt verbunden.



*Abb. 2.3 links: Position der Referenzelektrode in Form einer am Oberarm subkutan liegende Venenverweilkanüle; rechts: Position der Messelektrode unter der Concha nasalis inferior*

Die Referenzelektrode, eine Venenverweilkanüle, wird am Oberarm subkutan platziert und mit einem Pflaster fixiert.

Der Nabelarterienkatheter, der als Messelektrode dient, wird mit Hilfe eines an eine Kaltlichtquelle angeschlossenen Nasenspekulums direkt unter die Concha nasalis inferior eingebracht. Dabei sitzt der Patient dem Untersucher gegenüber. Der Kopf des Patienten ist auf einer Stütze fixiert und leicht rekliniert, damit eine bessere Sicht gewährleistet ist.

Um an die richtige Position zu gelangen, führt man den Messkatheter ca. 5 cm tief in die Nase ein und zieht ihn vorsichtig nach vorne in Richtung Nasenöffnung. Dabei wird als Messort der Potenzialdifferenz immer die Stelle des höchsten Messwertes gewählt, der mindestens 5 Sekunden stabil gehalten werden kann. Er befindet sich meist ca. 3-4 cm vom Naseneingang entfernt.

Der Wert der Potenzialdifferenz liegt zwischen 0 und 100 mV, hiervon abweichende Werte deuten auf einen Fehler im Versuchsaufbau hin.

Der Ausgangswert der PD wird zweimal an jeder Nasenseite gemessen, Abweichungen bis zu 5mV sind akzeptabel, sollten diese aber nicht überschreiten [23,49].

## **2.7 Versuchsaufbau der nasalen transepithelialen Potenzialdifferenzmessung mit Superfusion verschiedener Lösungen**

Der Versuchsaufbau entspricht dem der Grundmessung (vgl. Abb. 2.2). Zusätzlich werden aber noch zwei Dreiwegehähne zwischen das Infusionssystem und den Messkatheter geschaltet. Diese sind über Infusionssysteme jeweils mit einer Perfusionspumpe verbunden (Abb. 2.4). Die erste Pumpe enthält Amiloridlösung in einem chloridhaltigen Puffer, die zweite Amilorid in einem chloridfreiem Puffer und die dritte eine Lösung, die der zweiten entspricht und zusätzlich ein  $\beta$ -Sympathomimetikum enthält. In der vorliegenden Arbeit wurden Salbutamol und Isoproterenol verwendet, die sich als gleichwertig erwiesen haben [65].

Mit der zweiten Lösung (Amilorid in chloridfreiem Puffer) wird eine Stimulierung der alternativen Chloridkanäle angestrebt; bei ausreichender Funktion kommt es zu einem Ansteigen der PD. Diese Messung ist allerdings nur bei bestimmten Fragestellungen interessant und für die Routinediagnostik nicht notwendig, da dort die (bei CF fehlende) Stimulierbarkeit der CFTR-abhängigen Chloridkanäle im Vordergrund steht .

Dementsprechend ist es möglich, die dritte Lösung direkt (mit  $\beta$ -Sympathomimetikum) nach der ersten zu perfundieren, die Messung also zu verkürzen [71].



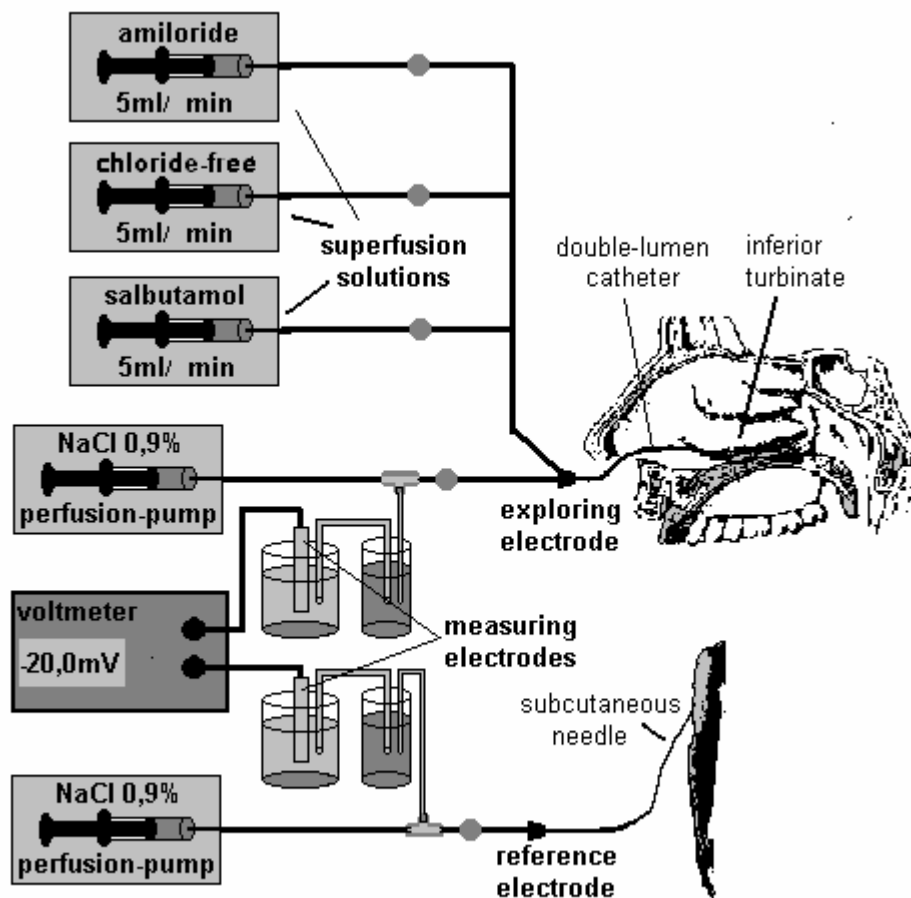


Abb. 2.4 Versuchsaufbau der nasalen transepithelialen Potenzialdifferenzmessung mit der Möglichkeit zur Superfusion verschiedener Lösungen (Amilorid, chloridfreie Lösung, Salbutamol). Einzelheiten im Text (vgl. Abb.2.2).

## 2.8 Zusammensetzung der verschiedenen Lösungen

Es wurden folgende Superfusionslösungen eingesetzt:

1. Amilorid-Lösung in chloridhaltigen KBR-Puffer
2. Amilorid-Lösung in chloridfreiem Puffer
3. Amilorid-Lösung in chloridfreiem Puffer und Salbutamol oder Isoproterenol

*Tabelle 2.1 Verwendete Superfusionslösungen:*

1. Amiloridlösung in chloridhaltigem KBR-Puffer (1000 ml)	2. Amiloridlösung in chloridfreiem Puffer (1000 ml)	3. Amiloridlösung in chloridfreiem Puffer und Salbutamol (1000 ml)
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 418mg	K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 418mg	K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 418mg
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 55mg	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 55mg	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 55mg
NaCl 6,721g	Na-Gluc. 25,081g	Na-Gluc. 25,081g
Na CO <sub>3</sub> 2,10 g	Na CO <sub>3</sub> 2,10 g	Na CO <sub>3</sub> 2,10 g
MgCl <sub>2</sub> 244mg	MgSO <sub>4</sub> 296mg	MgSO <sub>4</sub> 296mg
CaCl <sub>2</sub> 133mg	Ca-Gluconat 533mg	Ca-Gluconat 533mg
Amilorid 10Mol=30 mg =0,6 mg/ml = 0,003%	Amilorid 10 <sup>-4</sup> Mol=30 mg =0,6 mg/ml = 0,003%	Amilorid 10 <sup>-4</sup> Mol=30 mg =0,6 g/ml = 0,003%
		Salbutamol 10 <sup>-5</sup> Mol = 2,9 mg = 0,002884 mg/ml oder Isoproterenol 10 <sup>-5</sup>

Jede Lösung wurde 3 Minuten lang mit einem Flow von 300ml/h superfundiert (Menge: 15 ml in 3 min).

Alle Lösungen wurden von der Apotheke des Universitätsklinikums Gießen hergestellt. Nach eigenen Messungen sind sie in der Perfusorspritze mindestens über eine Woche stabil.

Amilorid ist lichtempfindlich und zerfällt bei längerer Aufbewahrung in elektrolythaltigen Puffern. Wie Messungen im HPLC-Labor des Zentrums für Kinderheilkunde der Universität zeigten, ist Amilorid in aqua dest. über zwei Jahre stabil.

## **2.9 Messvorgang der transepithelialen Potenzialdifferenzmessung mit Superfusion verschiedener Lösungen**

Der Messvorgang entspricht dem der Grundmessung. Nachdem der Messkatheter an der richtigen Stelle platziert ist, wird der Patient aufgefordert, den Kopf leicht nach vorne zu beugen. Dadurch wird verhindert, dass die applizierte Lösung geschluckt wird.

Anschließend wird der Dreivegehahn geöffnet und für drei Minuten Amiloridlösung perfundiert.

Nach drei Minuten wird der Hahn geschlossen und der Wert am Voltmeter abgelesen. Analog wird die chloridfreie Lösung und die Salbutamollösung appliziert und das Ergebnis registriert. Mit Hilfe einer speziell erarbeiteten Software wird der Kurvenverlauf zeitgleich mit der Messung aufgezeichnet. Es ergeben sich für Nicht-CF und CF-Patienten typische Kurvenverläufe, die in Abbildung 2.5 und 2.6 dargestellt sind.

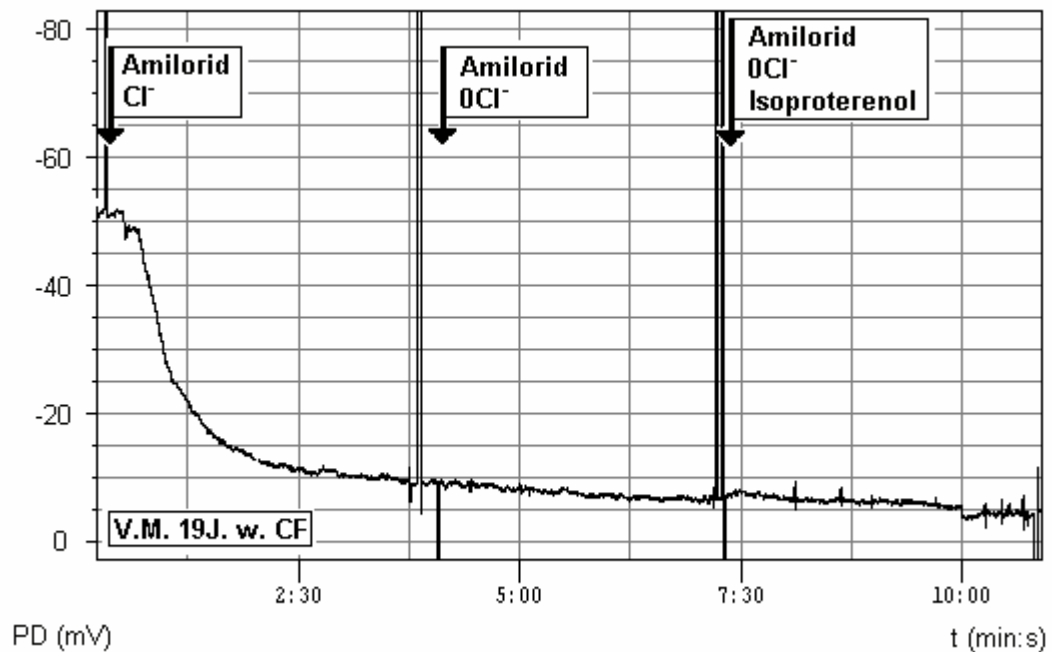


Abb. 2.5 Aufzeichnung der PD einer 19jährigen Mukoviszidose-Patientin:  
 Der Ausgangswert der Potenzialdifferenz liegt bei  $-53\text{ mV}$ , nach dreiminütiger Applikation der Amiloridlösung kommt es zu einem Abfall der PD-Werte auf  $-9\text{ mV}$ , also um  $44\text{ mV}$  (83,0%). Nach Gabe des chloridfreien Puffers (0Cl) werden Werte von  $-6\text{ mV}$  erreicht. Auch die Applikation von Salbutamol führt nicht zum Anstieg des PD-Wertes, sondern dieser fällt weiter auf  $-4\text{ mV}$  ab

**Fazit:** Es ist keine Stimulation der Chlorionenkanäle möglich. Es besteht eine für die Mukoviszidose typische Ionentransportstörung.

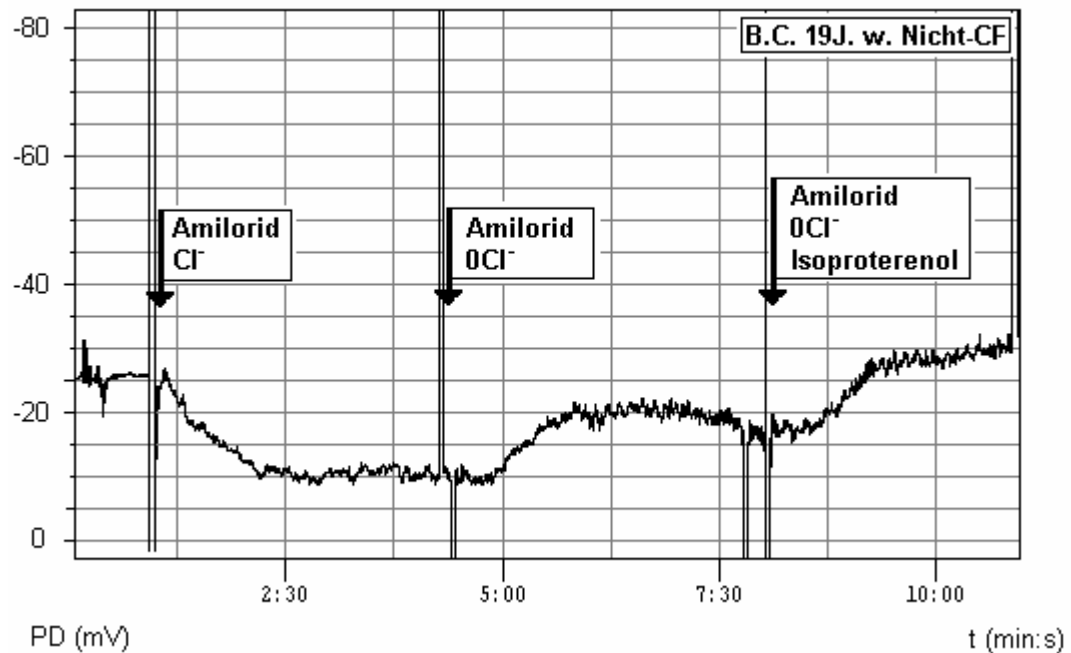


Abb. 2.6 PD- Aufzeichnung bei einer 19jährigen, gesunden Probandin:  
Der Ausgangswert der PD liegt deutlich niedriger als in Abb.2.9.1 (bei -26 mV). Nach dreiminütiger Applikation der Amiloridlösung kommt es zu einem Abfall der PD-Werte auf -10mV (61,5%). Nach Gabe des chloridfreien Puffers (0Cl) erfolgt eine Stimulation der alternativen Chlorionenkanäle. Es kommt zu einem Anstieg der PD auf -16 mV. Die Applikation von Salbutamol führt zu einem weiteren Anstieg der PD-Werte um 125% auf einen Wert von -30mV.

**Fazit:** Die Chlorionensekretion lässt sich durch das  $\beta$ -Sympathomimetikum stimulieren. Die für Mukoviszidose typische Ionentransportstörung kann ausgeschlossen werden.

## **2.10 Die transepitheliale Potenzialdifferenzmessung mittels Superfusion bei Säuglingen und Kleinkindern**

Bei Säuglingen und Kleinkindern ist die Messung der nasalen transepithelialen Potenzialdifferenz prinzipiell möglich, allerdings lassen sich hierbei in der Regel nur die Basiswerte ermitteln [72,73,74,75]. Die wesentlich aussagekräftigere Superfusionsmethode lässt sich aus verschiedenen Gründen nicht durchführen. Während der Applikation der Medikamente muss der Patient sechs Minuten lang mit leicht nach vorne gebeugtem Kopf still sitzen. Dies wird von Kleinkindern und Säuglingen nicht toleriert. Eine Messung an der nasalen Mukosa würde in der Regel eine Sedierung erfordern und müsste im Liegen erfolgen. Dies erscheint aufgrund der Aspirationsgefahr zu riskant.

Als Alternative zur Messung an der Nasalschleimhaut wurde daher die Messung an der Rektalschleimhaut in Betracht gezogen. Vorbedingung hierfür ist eine nicht entzündete oder durch chronisch entzündliche Darmerkrankungen veränderte Schleimhaut [76,77,78].

Versuche anderer Autoren waren erfolglos gewesen [79,80,81]. Nach anfänglichen Schwierigkeiten gelang es im PD-Labor der Universitätskinderklinik Gießen, die Hindernisse zu überwinden und ein probates Messverfahren zu entwickeln [82], das bislang noch nicht ausreichend validiert ist.

## **2.11 Messung der transepithelialen Potenzialdifferenz an der Rektalschleimhaut**

Der Messaufbau entspricht dem der nasalen Messung (s. Abb 2.4). Vorteil dieser Methode ist, dass Probanden im frühen Kindesalter im Liegen gemessen werden können und den Katheter im Rektum wesentlich besser tolerieren als in der Nase. Meist müssen die Kinder mild sediert werden, damit Bewegungsartefakte, die die Messung beeinflussen, vermieden werden. Es war zu hoffen, dass die Anwendung der Superfusionsmethode an der Rektalschleimhaut wie an der Nase die Differenzierung zwischen einer für Mukoviszidose typischen Ionentransportstörung und gesunden Patienten schon für Säuglinge ermöglicht. Procedere: Anstelle des Nabelarterienkatheters als Messelektrode wird ein etwas weicherer Katheter mit einem größeren Lumen verwendet. Als Einführhilfe dient ein Pferdeotoskop. Das Pferdeotoskop entspricht dem Otoskop für Menschen, zeichnet sich aber durch einen längeren Trichter aus, der sich für unsere Zwecke als gut geeignet erwies.

Vorbedingung für die Messung ist eine reizfreie, abgeführte Ampulla recti. Diese muss vor der Messung optisch kontrolliert werden. Erscheint die Schleimhaut der Ampulle reizfrei, führt man vorsichtig den Katheter ein und ermittelt durch vorsichtiges Zurückziehen den höchsten Wert der Potenzialdifferenz. An dieser Position verbleibt der Katheter. Anschließend erfolgt analog zur nasalen Messung die Superfusion der Amilorid- und der Salbutamolösung für jeweils drei Minuten, während der Verlauf der PD direkt mit dem Computer aufgezeichnet wird (Abb 2.7).

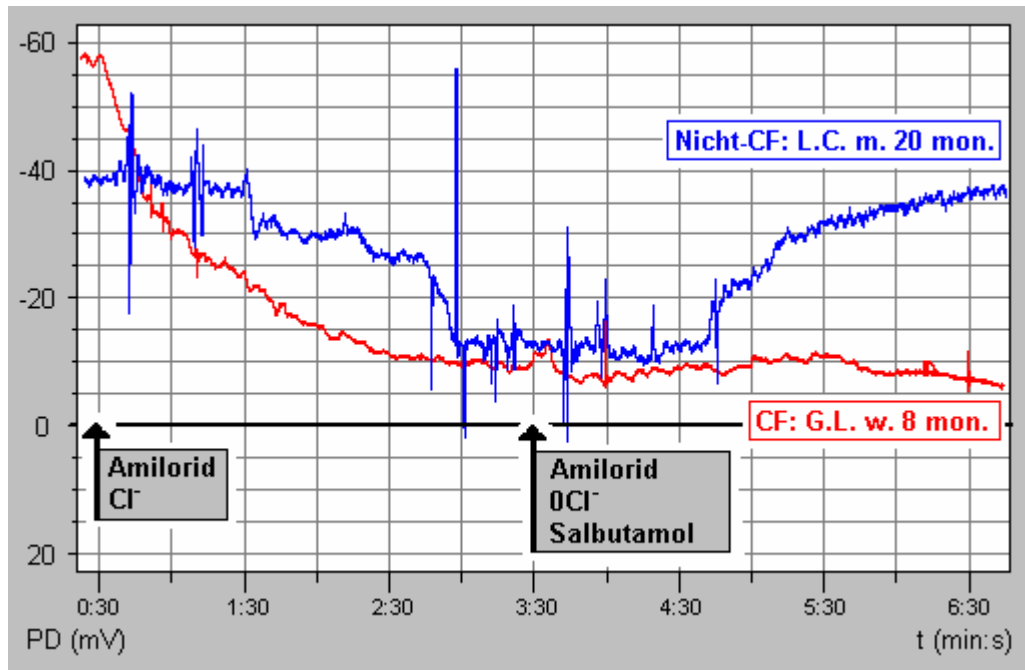


Abb. 2.7 Kurvenverlauf eines 20 Monate alten Kleinkindes ohne CF ( blau) und eines 8 monatigen, an Mukoviszidose erkrankten Säuglings (rot).  
 Der Ausgangswert der PD des gesunden Kindes liegt bei  $-39$  mV, nach dreiminütiger Superfusion der Amiloridlösung zeigt sich ein Abfall der PD auf  $-12$  mV, nach Gabe der Salbutamollösung ein Anstieg der PD auf  $-37$  mV.  
 Der Grundwert der CF-Patientin liegt bei  $-58$  mV, nach Gabe der Amiloridlösung fällt der PD-Wert auf  $-10$  mV ab und zeigt nach Superfusion des  $\beta$ -Sympathomimetikums keinen Anstieg, sondern fällt weiter auf  $-7$  mV (vgl. Abb.2.5 und 2.6).

Analog zur nasalen Messung zeigt der gesunde Säugling einen Wiederanstieg der PD nach Stimulation mit einem  $\beta$ -Mimetikum unter Natriumkanalblockade, bei dem an CF erkrankten Säugling findet sich ein typischer Kurvenverlauf ohne Wiederanstieg der PD.



## 2.12 Verwendung von direkt konnektierbaren Elektroden bei der Potenzialdifferenzmessung am Menschen

Die konventionelle Versuchsaufbau bedient sich -wie in Kapitel 2.5 und 2.7 beschrieben- eines kompliziert aufgebauten Systems von Agargelbrücken zur Vermeidung von Off-Set Potenzialen.

Um den Versuchsaufbau zu vereinfachen, verwendeten wir kommerziell erhältliche Ag/AgCl-Elektroden (Abb. 2.8), die direkt in das Flusssystem eingeschaltet werden können (Abb. 2.9). Sie wurden von WPI (World Precision Instruments) entwickelt und zeichnen sich durch ein stabiles, reproduzierbares Potenzial aus, haben einen sehr niedrigen Widerstand und einen extrem niedrigen Elektrolytdurchlass. Statt des Agargels befindet sich an der Spitze dieser Elektroden ein undurchlässiger Keramikstopfen (KONBO TM), der den Elektrolytfluss verhindert. Der Keramikstopfen hat eine Porengröße von 40 Angström, so dass die meisten organischen Moleküle nicht passieren können. Gefüllt sind die Elektroden mit KCl-Lösung .



*Abb. 2.8 Ag/AgCl-Elektrode der Firma WPI (World Precision Instruments)*

Das eine Ende dieser Elektroden lässt sich direkt in ein gebräuchliches Luer-Lock-System einschalten. In Pilotuntersuchungen zeigte sich, dass sie Elektroden nach längerer nutzungsfreier Episoden (>2 Tage), in KCl-Lösung eingelegt werden müssen. Bei korrekter Wartung findet sich ein stabiles, reproduzierbares Potenzial über einen Zeitraum von mehr als 9 Monaten.

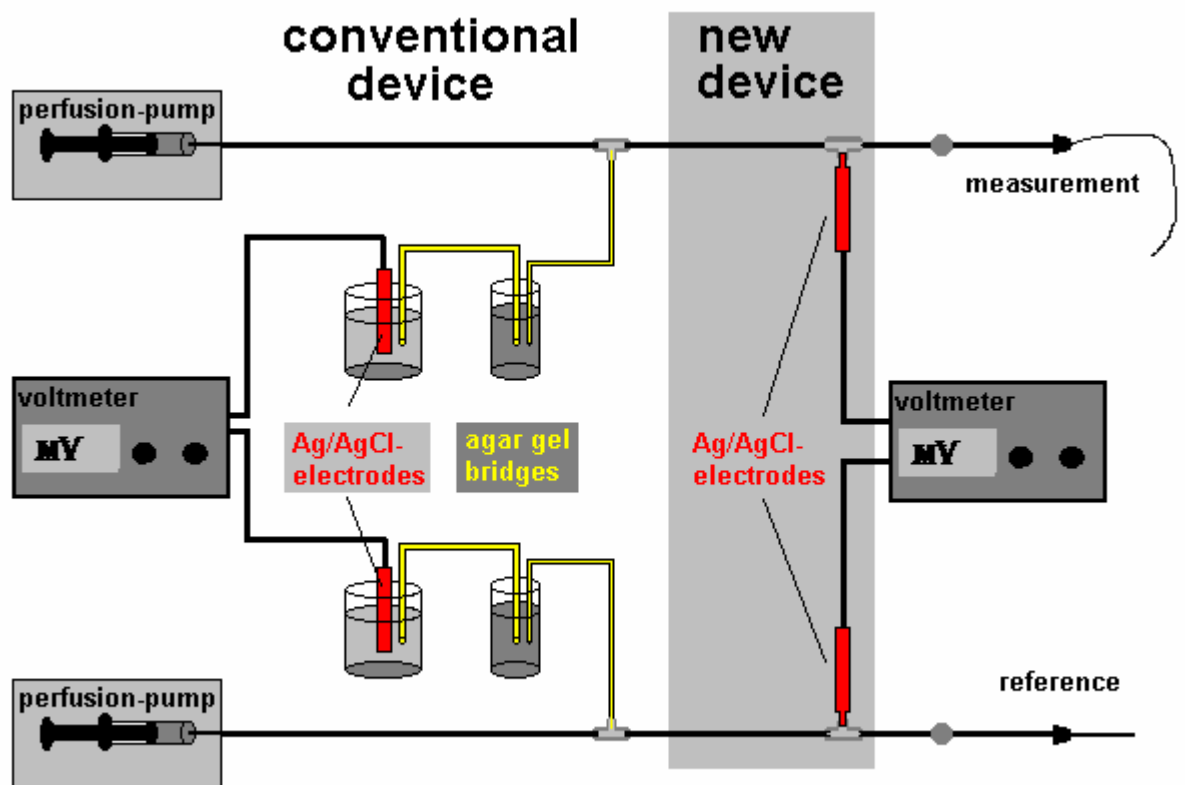


Abb. 2.9 konventioneller (links) und neuer Versuchsaufbau mit direkt in das Flusssystem eingeschalteten Elektroden (rechts, grau unterlegt).

### **2.13 Untersuchungen zum Einfluss verschiedener Flussgeschwindigkeiten bei der Superfusion auf die transepitheliale Potenzialdifferenz**

Seit langem werden Diskussionen über die erforderliche Flussgeschwindigkeit bei der Potenzialdifferenzmessung geführt [49,68,69]. Ein zu hoher Flow kann zu einer vermehrten Flüssigkeitsansammlung führen, die die Messung negativ beeinflussen kann, da der Katheter in einem „Flüssigkeitssee“ liegt. Das erschwert eine Messung über mehrere Minuten an exakt der gleichen Stelle. Dies ist jedoch Voraussetzung für die Superfusionsmethode. Ein zu niedriger Flow birgt das Risiko, dass nicht genug Lösung an die gemessene Stelle gelangt und somit die Wirkung an den Ionenkanälen nicht eindeutig interpretiert werden kann. Als Vorteile eines niedrigeren Flows sind die Materialeinsparung der Medikamente und die geringere Belastung der Patienten zu nennen.

Zur Klärung dieser Frage wurde der für die Superfusion beschriebene Versuchsaufbau benutzt (Abb.2.4). Üblicherweise werden die Superfusionslösungen mit einer hohen Flussgeschwindigkeit von  $15\text{ml}/3\text{min} = 300\text{ ml/h}$  perfundiert. Dabei wird Amilorid mit einer Konzentration von  $10^{-4}\text{ Mol}$  in einem Chlorid-Puffer und Salbutamol in einer Konzentration von  $10^{-5}$  in einer chloridfreien Amiloridlösung verwendet (siehe Tabelle 2.1).

Auf Verwendung der chloridfreien Lösung ohne Salbutamol wurde verzichtet, da die „alternativen Chloridkanäle“ im Rahmen der Diagnostik zu vernachlässigen sind.

Ziel war es, zur Erleichterung der Superfusionsmessung eine praktikable niedrigere Flussgeschwindigkeit zu ermitteln, die dennoch zuverlässige Messergebnisse liefert.

Dazu wurde die Messung der nasalen transepithelialen Potenzialdifferenz bei normaler Superfusion mit herkömmlicher Flussgeschwindigkeit von  $300\text{ ml/h}$  mit Flusstärken von  $100\text{ ml/h}$  und  $10\text{ ml/h}$  verglichen.

Die unterschiedlichen Flusstärken wurden als hoher (300 ml/ h), mittlerer (100 ml/h) und niedriger (10 ml/h) Flow bezeichnet (Tabelle 2.2).

*Tabelle 2.2 Zusammensetzung und Flussgeschwindigkeiten der Lösungen*

	Amilorid ( $10^{-4}$ mol) in KBR Puffer	Salbutamol ( $10^{-5}$ mol) in Amilorid + Chloridfreiem Puffer
hoher Flow	300 ml/h	300 ml/h
mittlerer Flow	100 ml/h	100 ml/h
niedriger Flow	10 ml/h	10 ml/h

## 2.14 Direktvergleich der nasalen und der rektalen Potenzialdifferenzmessung in vivo

In einer weiteren Studie wurde das Messverfahren an Nasal- und Rektalschleimhaut durchgeführt und miteinander verglichen.

Vorbedingung für die Messung war eine reizfreie, nicht entzündete Schleimhaut, sowohl nasal als auch rektal und -bei der rektalen Messung- eine abgeführte Ampulla recti.

Wie bereits in Kapitel 2.9 beschrieben, wurde zuerst eine Amiloridlösung, danach eine Amilorid- / chloridfreie- / Salbutamollösung jeweils über 3 Minuten perfundiert. Mittels Zweikanalschreiber wurden die Kurven registriert (Abb. 2.10 und 2.11).

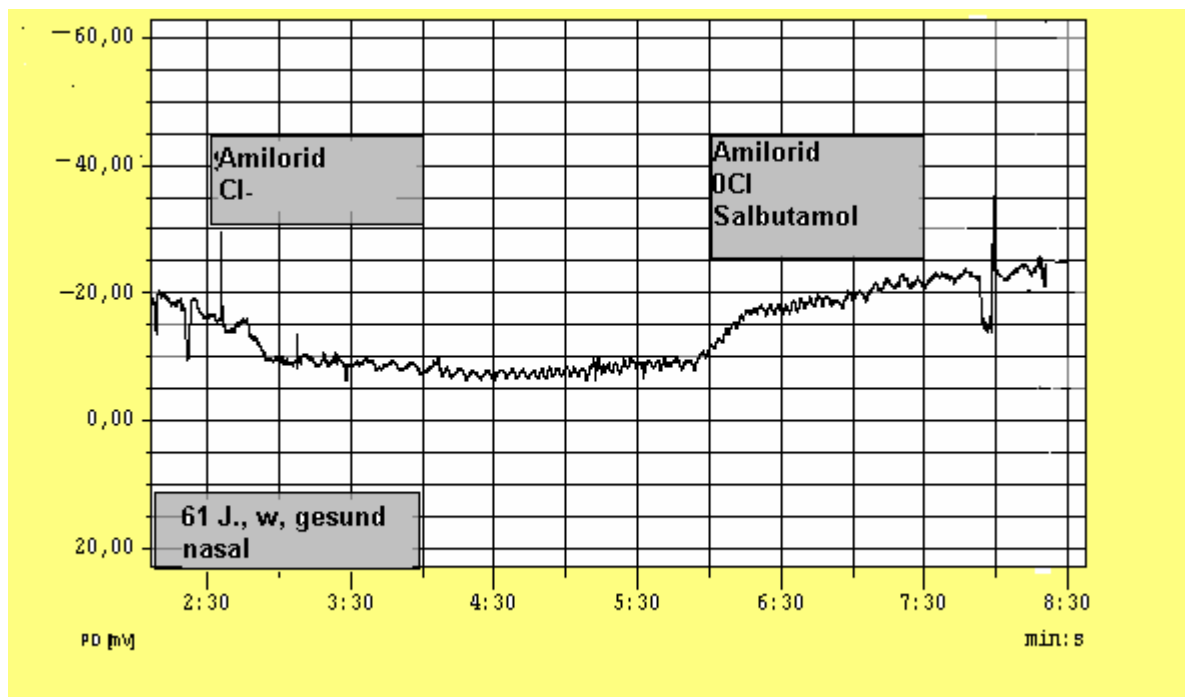
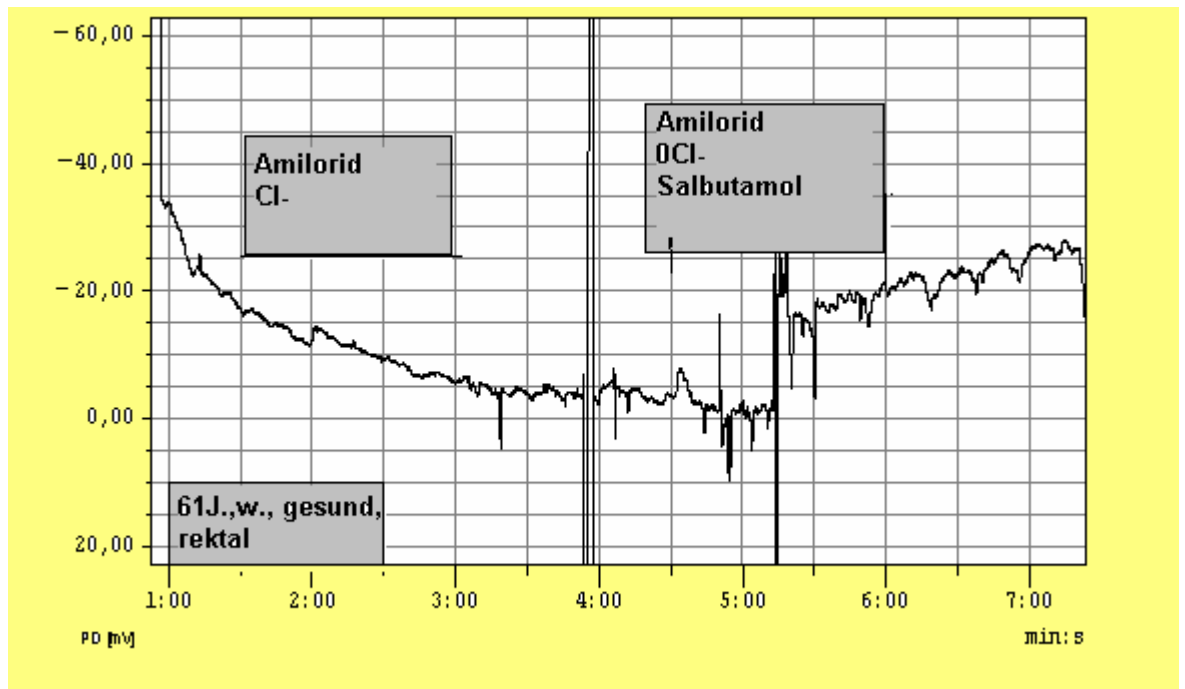


Abb.2.10 Superfusionskurve einer 61jährigen, gesunden Probandin, nasal gemessen, mit deutlichem Anstieg der Potenzialdifferenz (PD) unter Salbutamol. Weitere Erläuterungen im Text.



*Abb.2.11 Superfusionskurve einer 61jährigen, gesunden Probandin, rektal gemessen, mit deutlichem Anstieg der PD unter Salbutamol. Weitere Erläuterungen im Text.*

Nasal gemessen ergab sich bei der 61jährigen Probandin, deren PD -Verlauf exemplarisch dargestellt ist, ein mittlerer Ausgangswert vor Superfusion von -20 mV. Nach Applikation des Amilorids fiel die Potenzialdifferenz auf -8 mV, nach Salbutamolgabe kam es zu einem Anstieg auf -24 mV (vgl. Abb.2.10). Bei der rektalen Messung fanden sich mittlere Ausgangswerte von -34 mV, nach Amiloridgabe kam es zu einem PD-Abfall auf -5 mV. Nach Salbutamolgabe wurde ein Wiederanstieg auf -27 mV registriert (Abb.2.11).

## **2.15 Probanden –und Patientenkollektive**

### **2.15.1 Vergleich von direkt konnektierbaren und konventionellen Elektroden**

Bei 34 gesunden Probanden im Alter von 23 bis 61 Jahren (Mittelwert: 28,4, Median: 26,0) und 15 CF-Patienten im Alter von 12 bis 34 Jahren (Mittelwert: 23,6; Median: 25,0) wurden alternierend und simultan Messungen mit direkt konnektierbaren und konventionellen Elektroden durchgeführt und miteinander verglichen.

### **2.15. 2 Vergleich verschiedener Flusstärken**

Bei 19 nicht an CF erkrankten Probanden wurden Superfusionsmessungen mit einem hohen und mittleren Flow, 100 ml/h bzw. 300 ml/h, durchgeführt. Bei 11 dieser Probanden erfolgte eine weitere Messung mit einem niedrigen Flow (10 ml/h).

Um zusätzlich einen Einfluss der Konzentration der Medikamente beurteilen zu können, wurde bei 10 gesunden Probanden eine weitere Messung mit einem niedrigen Flow (10 ml/h) durchgeführt, wobei die Superfusionslösungen in zehnfach erhöhter Konzentration verabreicht wurden: Amilorid in einer Konzentration von  $10^{-5}$  und Salbutamol in einer Konzentration von  $10^{-4}$  mol.

### **2.15.3 Vergleich von nasaler und rektaler PD**

Bei 15 gesunden Probanden im Alter zwischen 4 und 61 Jahren (Mittelwert: 30,8 Jahre, Median: 24,8 Jahre) und einem CF-Patienten (18 Jahre), dessen

Diagnose durch einen positiven Schweißtest, eine nachgewiesene Pankreasinsuffizienz und eine positive Genanalyse gesichert war, wurden Potenzialdifferenzmessungen sowohl an der Mukosa der Nase als auch an der des Rektums durchgeführt und die Ergebnisse direkt miteinander verglichen.

## **2.16 Statistische Methoden**

Es wurden die üblichen Methoden der deskriptiven Statistik angewendet.

Dabei gibt  $n$  den Stichprobenumfang wieder, d.h. die Anzahl der Probanden, die gemessen wurden. Die Ergebnisse sind in absoluten und prozentualen Werten dargestellt. Die prozentualen Abfälle nach Amilorid beziehen sich auf Null, die prozentualen Wiederanstiege nach Applikation des  $\beta$ -Mimetikums beziehen sich auf die individuellen Abfälle nach Amilorid, die 100% gesetzt werden.

Die jeweiligen Zielgrößen, wie beispielsweise der Wieder- bzw. Nichtanstieg nach Applikation des  $\beta$ -Sympathomimetikums wurde anhand von Mittelwert, Median, Standardabweichung und größter (Max.) und kleinster (Min.) Merkmalsausprägung der jeweiligen PD-Werte ermittelt.

Weiterhin wurde nach den üblichen statistischen Methoden die Korrelation ( $r$ ) berechnet und in Form von Regressionsgeraden dargestellt.

Die statistischen Wahrscheinlichkeiten wurden bei Normalverteilung der Differenzen mit dem t-Test für abhängige Stichproben ermittelt [83]. War die Irrtumswahrscheinlichkeit ( $p$ )  $< 0,05$ , wurde das Ergebnis als statistisch signifikant gewertet.

Zur graphischen Darstellung und Auswertung der Daten wurden die Statistikprogramme WinSTAT 3.1 und ORIGIN 6.1 verwendet.



## Ergebnisse:

### 3.1 Vergleich von direkt konnektierbaren Elektroden mit der konventionellen Methode bei der Potenzialdifferenzmessung

Bei 15 CF-Patienten und 34 Nicht CF-Probanden im Alter zwischen 12 und 61 Jahren wurden mit dem Ziel der Vereinfachung des Messverfahrens bei der PD-Messung Potenzialdifferenzmessungen mit direkt konnektierbaren Elektroden und der konventionellen Methode durchgeführt und die Kurvenverläufe simultan und alternierend aufgezeichnet. Vor jeder Messung wurde mit beiden Methoden der Nullabgleich überprüft. Hier fanden sich mit beiden Methoden exakt die gleichen Werte. Größere Abweichungen als 2 mV wurden nicht beobachtet. Die beiden Messverfahren beeinflussten sich nicht gegenseitig.

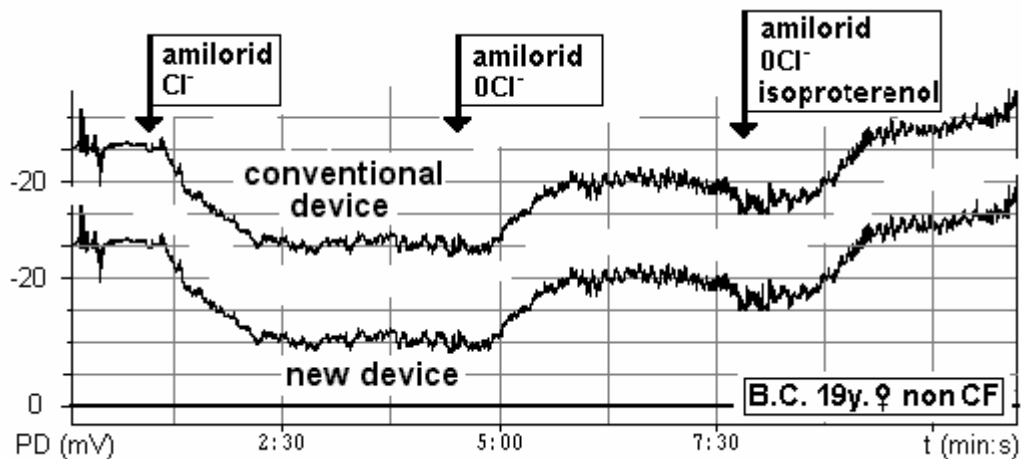


Abb.3.1 Registrierung der nasalen Potenzialdifferenz (PD) mit konventioneller Methodik (oben) und direkt konnektierbaren Elektroden (unten) bei einer 19jährigen gesunden Probandin. Nach Bestimmung der Ausgangswerte der PD erfolgte deren kontinuierliche Aufzeichnung unter Amilorid, chloridfreier Lösung ( $0\text{Cl}^-$ ) und Isoproterenol.

Die mittlere, basale PD von –26 mV sank nach Applikation der Amiloridlösung übereinstimmend auf –10 mV, stieg dann nach der Gabe einer chloridfreien Lösung wieder auf –20mV, und schließlich nach Gabe eines  $\beta$ -Sympathomimetikums auf –29 mV an. Bei der PD-Mesung konnten mit beiden Methoden exakt die gleichen Kurvenverläufe dargestellt werden (Abb. 3.1). Die absoluten Messdaten stimmten völlig überein (Tab. 3.1 und 3.2).

*Tabelle:3.1 Resultate der PD-Messungen (in mV) gesunder Probanden ermittelt mit konventionellen (konv.) und direkt konnektierbaren Elektroden (neu)*

	vor SF konv.	vor SF neu	SFA konv.	SFA neu	SFS konv.	SFS neu	$\Delta$ PD SFS konv.	$\Delta$ PD SFS neu	$\Delta$ PD SFS (%) konv.	$\Delta$ PD SFS (%) neu
Fälle	34	34	34	34	34	34	34	34	34	34
Mittelwert	-24,5	-24,5	-8,3	-8,3	-21,5	21,5	13	13	84,0	84,0
Standabw.	9,9	9,9	3,8	3,8	8,9	8,9	7,9	7,9	29,2	29,2
Median	22,5	22,5	-8	-8	-18	-18	12,0	12,0	68,3	68,3
Minimum	-45	-45	-15	-15	-47	-47	3	3	50	50
Maximum	-12	-12	-8	-8	-7	-7	37	37	140	140

$\Delta$ PD bzw.  $\Delta$ PD (%) = Differenz der PD absolut bzw. prozentual, r = rektal, n = nasal  
SF=Superfusion, A=Amilorid, S=Salbutamol

*Tabelle 3.2: Resultate der PD-Messungen (in mV) von CF-Patienten ermittelt mit konventionellen (konv.) und direkt konnektierbaren Elektroden (neu)*

	vor SF konv.	vor SF neu	SFA konv.	SFA neu	SFS konv.	SFS neu	$\Delta$ PD SFS konv.	$\Delta$ PD SFS neu	$\Delta$ PD SFS (%) konv.	$\Delta$ PD SFS (%) neu
Fälle	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15
Mittelwert	-45,6	-45,6	-11,7	-11,7	-8,3	-8,3	-3,4	-3,4	-10,4	-10,4
Standabw.	6,5	6,5	3,5	3,5	4,3	4,3	2,8	2,8	7,9	7,9
Median	-46	-46	-11	-11	-8	-8	-2	-2	-8	-8
Minimum	-55	-55	-18	-18	-14	-14	-8	-8	-24,2	-24,2
Maximum	-35	-35	-8	-8	-3	-3	0	0	0	0

$\Delta$ PD bzw.  $\Delta$ PD (%) = Differenz der PD absolut bzw. prozentual, r = rektal, n = nasal  
SF=Superfusion, A=Amilorid, S=Salbutamol

Mit beiden Methoden ergab sich ein medianer Ausgangswert von -22,5 mV bei gesunden Probanden und von -46,0 mV bei CF-Patienten. Nach Applikation des Amilorid kam es zu einem Abfall der PD-Werte auf -8,0 mV bei den gesunden Probanden und auf -11mV bei den CF-Patienten. Auch diese Werte stimmten mit beiden Methoden exakt überein. Dies spiegelt sich in einem Korrelationskoeffizienten von 1,0 wieder.

Bei Superfusion eines  $\beta$ -Sympathomimetikums zeigte sich mit beiden Methoden ein eindeutiger Anstieg der PD-Werte. Bei den gesunden Probanden betrug er 12,0 mV, das entspricht einem prozentualen Anstieg von 68,3%. Bei CF-Patienten fehlte dieser Anstieg erwartungsgemäß. Die PD sank durchschnittlich sogar noch um 8 mV (-24,2%) ab.

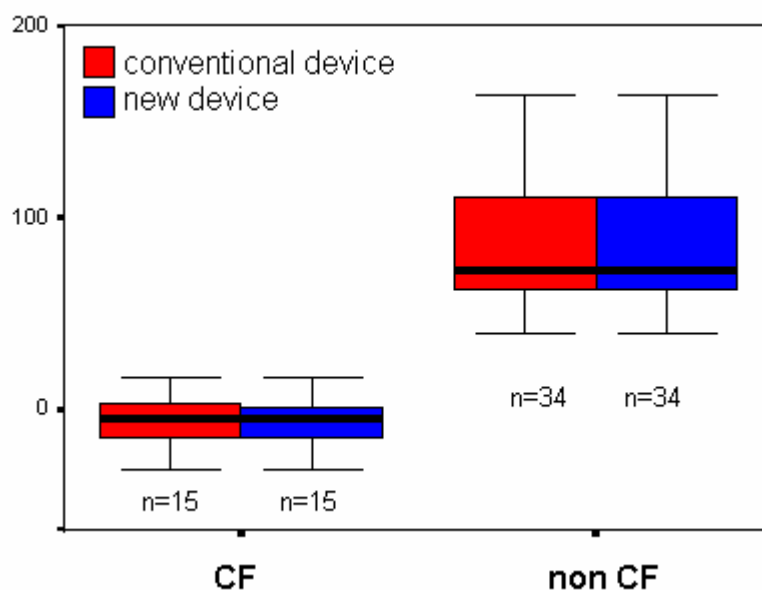
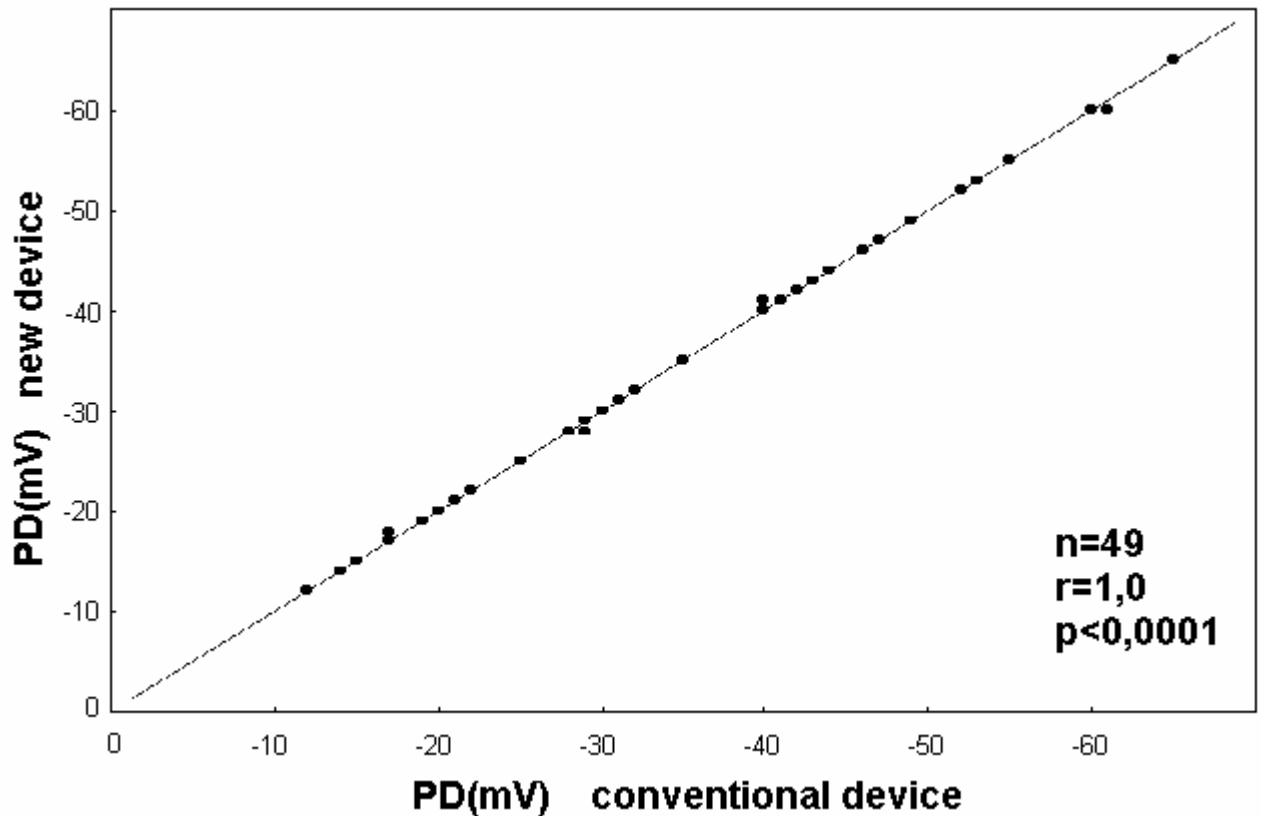


Abb.3.2 Prozentualer Anstieg der Potenzialdifferenz nach Superfusion eines  $\beta$ -Sympathomimetikums dargestellt als Boxplot-Diagramm mit der konventionellen Methode (rot) und den direkt konnektierbaren Elektroden (blau). Die Markierungen bedeuten Median, 25. und 75. sowie 5. und 95. Perzentile.

Wie Abb. 3.2 deutlich veranschaulicht, ist eine Einteilung in CF-Patienten und Nicht CF-Probanden mit beiden Methoden eindeutig möglich.



*Abb.3.3 Regressionsgeraden für die Korrelation der Messergebnisse der Potenzialdifferenz (PD), die mit der konventionellen und der neuen Methode gemessen wurden. Hier dargestellt sind die Basalwerte vor Superfusion.*

Die Korrelation beträgt  $r=1$  bei einer Irrtumswahrscheinlichkeit von  $p<0,0001$ . Eine ebenso gute Übereinstimmung ergab sich auch bei Vergleich der PD-Werte nach der Superfusion des Amilorids bzw. des  $\beta$ -Sympathomimetikums, die hier nicht dargestellt sind.

### **3.2 Vergleich der Wirkung verschiedener Flusstärken- und konzentrationen der Superfusionslösungen auf die nasale transepitheliale Potenzialdifferenz**

Ziel dieser Studie war es herauszufinden, inwieweit die Flußgeschwindigkeit der Superfusionslösungen einen Einfluss auf die Messergebnisse hat. Hierzu wurden PD-Messungen bei 19 gesunde Probanden im Alter von 22 –62 Jahren zuerst mit dem gebräuchlichen Flow von 300ml/h, in einer zweiten Sitzung mit einem niedrigeren Flow von 100ml/h durchgeführt und die Werte miteinander verglichen.

In einer dritten Versuchsreihe wurde an 11 gesunden Probanden im Alter zwischen 23 und 27 Jahren eine weitere Messung mit einem Flow von 10 ml/h durchgeführt.

Bei 10 gesunden Probanden im Alter zwischen 22 und 27 Jahren wurde in einer letzten Messung ein Flow von 10 ml/h verwendet, die Superfusionslösungen enthielten bei dieser Messung allerdings eine zehnfach erhöhte Dosis an Medikamenten.

Die statistische Auswertung der Messergebnisse erfolgte trotz mehrerer Messungen an einer Person aufgrund der chronologischen Reihenfolge mit dem t-Test für abhängige Stichproben. Die verminderten Flussgeschwindigkeiten sollten einzeln mit der international etablierten Methode, die den hohen Fluß (300 ml/h) verwendet , verglichen werden. Um das multiple Testen zu berücksichtigen wurde das Signifikanzniveau mit der Bonferoni-Korrektur angepasst.

**Tabelle 3.3: Resultate der PD-Messung bei verschiedenen Flussstärken (Flow) der Superfusionslösungen (SF)**

Alter (Jahren)	FLOW 100 ml/h Ami 0,04522mg/min Salbu 0,004896mg/min			FLOW 300 ml/h Ami 0,13566 mg/min Salbu 0,014688 mg/min			FLOW 10 ml/h Ami 0,004522mg/min Salbu 0,000489mg/min			FLOW 10 ml/h Ami 0,04522mg/min Salbu 0,004896mg/min		
	Vor SF	SFA	SFS	Vor SF	SFA	SFS	Vor SF	SFA	SFS	Vor SF	SFA	SFS
27,6	-32	-14	-28	-26	-12	-24	-28	-12	-25	-21	-12	-20
23,3	-22	-6	-20	-17	-9	-23	-18	-5	-12	-25	-14	-18
23,3	-16	-9	-18	-19	-7	-20	-15	-5	-12	-16	-7	-11
23,1	-23	-15	-21	-19	-8	-15	-24	-14	-19			
23,1	-24	-13	-20	-18	-9	-18						
24,8	-39	-12	-30	-35	-19	-36	-28	-12	-18	-32	-15	-28
24,8	-33	-20	-30	-20	-12	-18	-20	-9	-15	-25	-7	-14
24,8	-44	-30	-60	-30	-10	-34	-21	-13	-18	-23	-8	-16
22,0	-25	-14	-21	-19	-9	-27						
25,2	-23	-6	-19	-15	-7	-12	-17	-7	-9			
25,2	-27	-7	-21	-19	-12	-20	-15	-7	-7			
25,9	-7	+7	-8	-15	-5	-19						
26,3	-17	-12	-16	-24	-6	-20	-30	-15	-20			
25,2	-30	-16	-26	-25	-13	-21				-32	-11	-20
26,4	24	-8	-17	-28	-13	-23				-22	-8	-17
23,0	-18	-9	-20	-20	-7	-16	-14	-10	-11	-16	-7	-11
22,9	-26	-10	-24	-28	-7	-28				-20	-8	-14
60,7	-15	-6	-13	-15	-7	-12						
62,1	-21	-8	-24	-19	-12	-23						

SF=Superfusion, Ami (A)=Amilorid, Salbu (S)=Salbutamol

**Tabelle 3.4: Deskriptive Statistik der PD-Werte vor Superfusion (vSF) mit verschiedenen Flussstärken**

100vSF: Flow 100ml/h

300vSF: Flow 300ml/h

10 vSF: Flow 10 ml/h

c10v SF:Flow 10ml/h mit 10x höherer Medikamentenkonzentration

	100 vSF	300 vSF	10 vSF	C10 vSF
Fälle	19	19	11	10
Mittelwert	-24,5263	-21,6316	-20,9091	-23,2000
Std.Abweichung	8,65620	5,63925	5,78713	5,59365
Median	-24,0000	-19,0000	-20,0000	-22,5000
Minimum	-44,0000	-35,0000	-30,0000	-32,0000
Maximum	-7,00000	-15,0000	-14,0000	-16,00

**Tabelle 3.5: Deskriptive Statistik der PD-Werte nach Superfusion verschiedener Lösung mit unterschiedlichen Flussstärken**

100: Flow 100ml/h vSF= vor Superfusion, dPD= delta PD, A=Amilorid, S=Salbutamol

300: Flow 300ml/h %= prozentualer Abfall bzw Anstieg

10: Flow 10 ml/h

c10: Flow 10ml/h mit 10x höherer Medikamentenkonzentration

	100 vSF	100dPDA	100dPDS	100dPD%A	100dPD%S
Fälle	19	19	19	19	19
Mittelwert	-24,5263	13,5789	12,0000	61,1553	90,8358
Std.Abweichung	8,65620	5,13502	5,79272	36,5658	36,6339
Variationskoeff.	*****	0,37816	0,48272	0,59791	0,40329
rel.V.koeff.(%)	*****	8,67559	11,0745	13,7172	9,25229
Minimum	-44,0000	5,00000	4,00000	29,4100	56,2500
Maximum	-7,00000	27,0000	30,0000	200,000	214,290
Median	-24,0000	14,0000	11,0000	56,2500	77,7800

	300 vSF	300dPDA	300dPDS	300dPD%A	300dPD%S
Fälle	19	19	19	19	19
Mittelwert	-21,6316	11,9474	11,8421	54,7658	101,616
Std.Abweichung	5,63925	4,36493	5,33607	11,4716	38,1365
Variationskoeff.	*****	0,36534	0,45060	0,20946	0,37529
rel.V.koeff.(%)	*****	8,38163	10,3375	4,80549	8,60995
Minimum	-35,0000	7,00000	5,00000	36,8400	62,5000
Maximum	-15,0000	21,0000	24,0000	75,0000	180,000
Median	-19,0000	11,0000	11,0000	53,3300	100,000

	10 vSF	10dPDA	10dPDS	10dPD%A	10dPD%S
Fälle	11	11	11	11	11
Mittelwert	-20,9091	11,0000	5,18182	52,6055	44,3618
Std.Abweichung	5,78713	3,74166	3,51620	12,5818	23,8281
Variationskoeff.	*****	0,34015	0,67856	0,23917	0,53713
rel.V.koeff.(%)	*****	10,2559	20,4595	7,21136	16,1951
Minimum	-30,0000	4,00000	0,00000	28,5700	0,00000
Maximum	-14,0000	16,0000	13,0000	72,2200	81,2500
Median	-20,0000	10,0000	5,00000	55,0000	50,0000

	C10 vSF	C10dPDA	C10dPDS	C10dPD%A	C10dPD%S
Fälle	10	10	10	10	10
Mittelwert	-23,2000	13,5000	7,20000	57,8980	53,9970
Std.Abweichung	5,59365	4,22295	2,85968	9,41106	17,2913
Variationskoeff.	*****	0,31281	0,39717	0,16254	0,32022
rel.V.koeff.(%)	*****	9,89196	12,5599	5,14014	10,1265
Minimum	-32,0000	9,00000	4,00000	42,8600	36,3600
Maximum	-16,0000	21,0000	13,0000	72,0000	88,8900
Median	-22,5000	13,0000	7,50000	58,1250	47,2200

Ein Vergleich der Basalwerte vor Superfusion zeigte leichte Unterschiede. Mit dem hohen Flow (300 ml/h) ergab sich ein medianer PD-Wert von -24,0 mV, der mittlere Flow zeigte einen medianen Basalwert von -19,0 mV. Mit dem niedrigen Flow mit normaler Konzentration ergab sich ein mittlerer Ausgangswert von -20 mV, und bei den Basalwerten vor Perfusion der konzentrierten Lösung mit dem niedrigen Flow zeigte sich ein Wert von 22,5 mV (Abb. 3. 4)

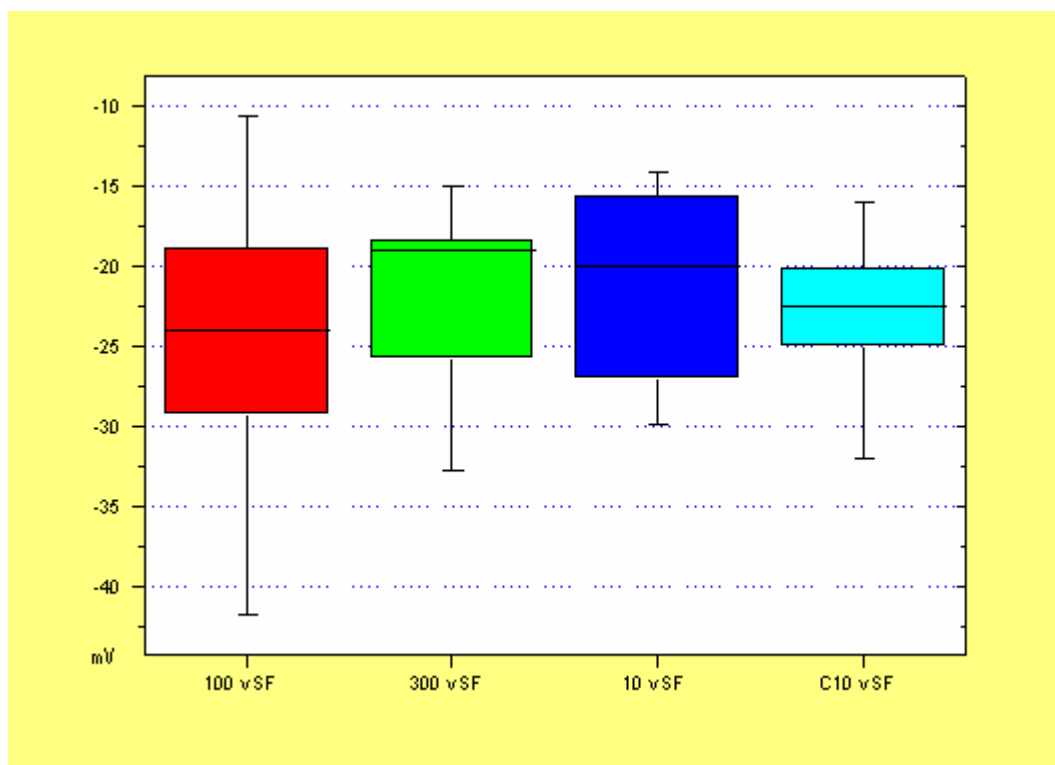


Abb. 3.4 Vergleich der PD-Werte vor Superfusion (Abkürzungen siehe Tab 3.5)



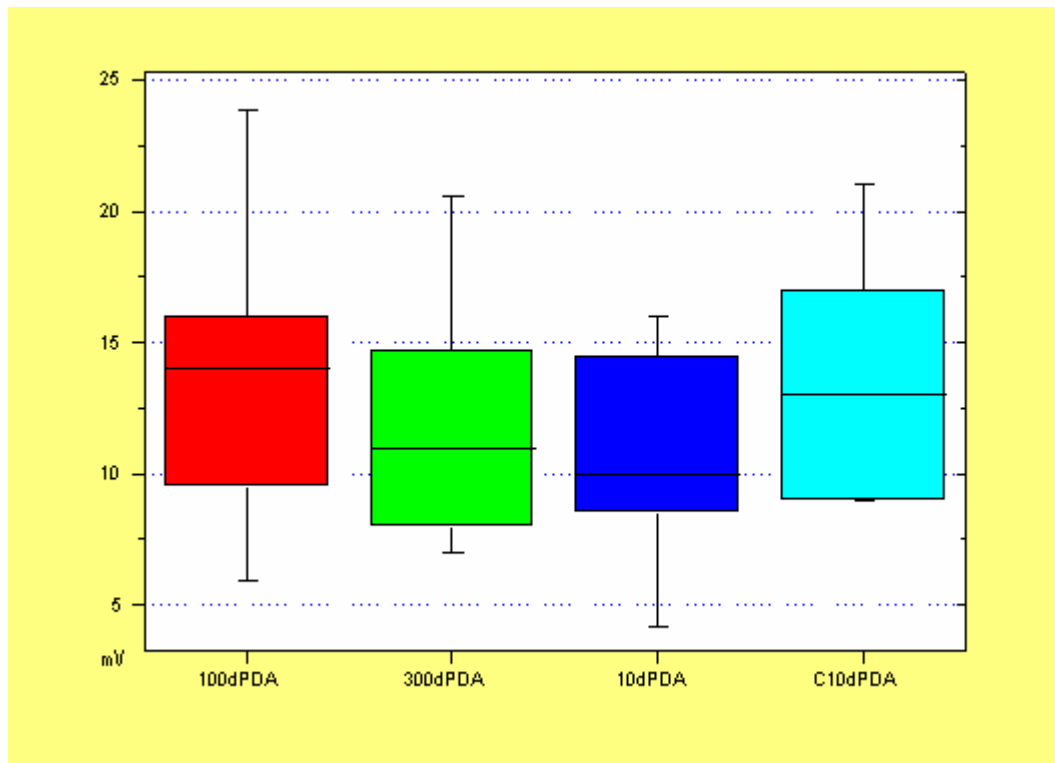
Im t-Test für abhängige Stichproben ergab sich kein signifikanter Unterschied zwischen den PD-Werten, die mit dem gebräuchlichen Flow von 300 ml/h ermittelt wurden, im Vergleich zu den niedrigeren Flüssen. ( $p_{300/100}=0,05$ ;  $p_{300/10}=0,4$ ;  $p_{300/c10}=0,4$ )

Nach der Gabe von Amilorid kam es mit allen Flußstärken zu einem deutlichen Absinken der Potenzialdifferenzwerte. Mit Perfusion des hohen Flows (300ml/h) sowie des niedrigen Flows mit normaler Konzentration (10ml/h) kam es zu einem geringeren Abfall als mit dem mittleren Flow (100 ml/h) und dem niedrigen Flow mit hoher Konzentration (10ml/h). Die PD-Werte sanken beim hohen Flow um im Mittel 11,0 mV ( 53,3%), beim mittleren Flow um 14 mV ( 56,25 %), beim niedrigen Flow um 10 mV ( 55,0%) und beim niedrigen Flow mit höher konzentrierten Lösungen im Mittel um 13 mV ( 58,13%) (Abb.3.2.2). Alle Werte sind noch einmal in einer Übersicht in Tabelle 3.6 zusammengestellt.

*Tabelle 3.6: Mediane Resultate der PD (Potenzialdifferenz) vor und nach Superfusion (SF) von Amilorid (A) mit unterschiedlichen Flows*

	Hoher Flow (300ml/h)	Mittlerer Flow (100ml/h)	niedriger Flow (10ml/h)	niedriger Flow/ hohe Konzentration (10ml/h)
Basal PD	-24,0 mV	-19,0 mV	-20,0 mV	-22,5 mV
$\Delta$ PD SFA	11,0 mV	14,0 mV	10,0 mV	13,0 mV
$\Delta$ PD SFA (%)	53,3	56,25	55,5	58,13

$\Delta$ PD bzw.  $\Delta$ PD(%)= Veränderung der Potenzialdifferenz absolut bzw. prozentual



*Abb. 3.5 Darstellung des absoluten Abfalls der PD-Werte nach Superfusion von Amilorid mit verschiedenen Flussstärken (Abkürzungen siehe Tab.3.5)*

Im t-Test für abhängige Stichproben ergab sich erneut kein signifikanter Unterschied zwischen den mit dem gebräuchlichen Flow von 300 ml/h ermittelten PD-Werten nach der Superfusion von Amilorid und den PD-Werten der niedrigeren Flüsse. ( $p_{300/100}=0,47$ ;  $p_{300/10}=0,71$ ;  $p_{300/c10}=0,66$ )

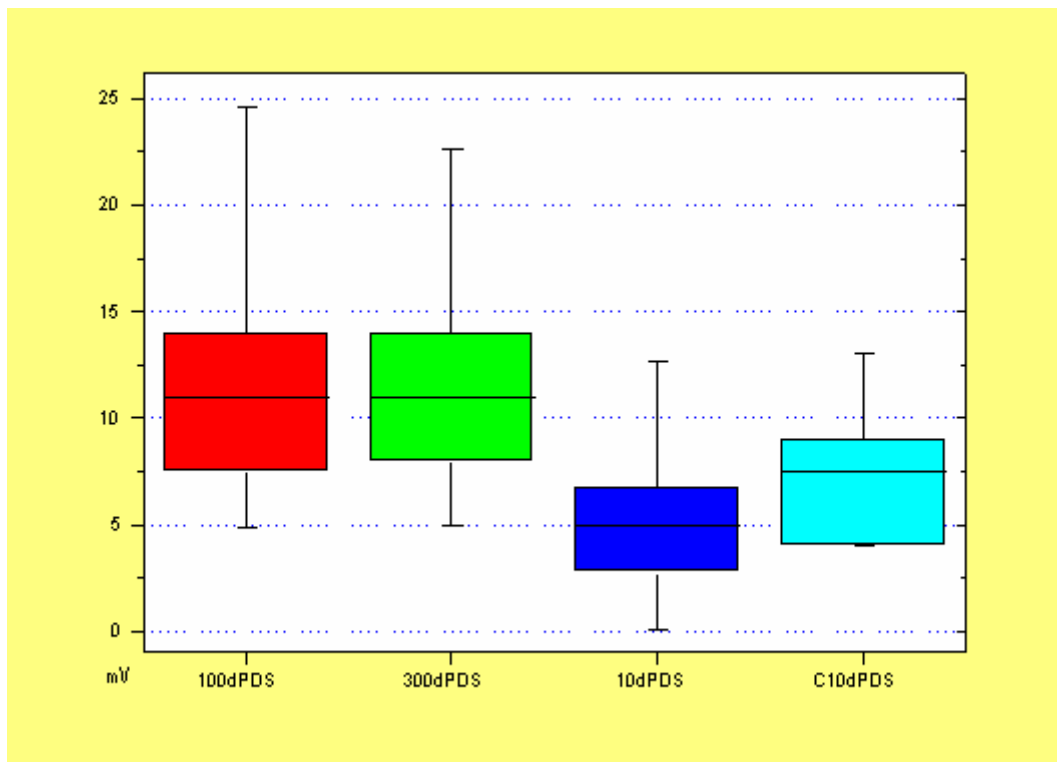
Nach Superfusion des Salbutamols kam es mit allen Flußstärken zu einer positiven Reaktion, d.h. zu einem Ansteigen der PD-Werte. Allerdings war der Anstieg bei Verwendung des hohen und des mittleren Flows wesentlich deutlicher ausgeprägt als bei Messung mit dem niedrigen Flow, sowohl in normaler, als auch in erhöhter Konzentration. Die Reaktion auf das Salbutamol war mit dem hohen und dem mittleren Fluß etwa gleich.

Der mediane Anstieg nach Gabe des Salbutamols betrug mit dem hohen Flow 11,0 mV (100,0%), mit dem mittleren Flow 11 mV ( 77,8%), mit dem niedrigen Flow im Mittel 5 mV ( 50,0%) und mit dem niedrigen Fluß und erhöhter Konzentration im Mittel 7,5 mV ( 47,22%). Auch diese Werte sind noch einmal als Übersicht in Tabelle 3.7 abgebildet.

*Tabelle 3.7: Resultate der PD-Messung (Potentialdifferenz) nach Superfusion (SF) von Salbutamol (S) mit unterschiedlichen Flußstärken*

	hoher Flow (300ml/h)	mittlere Flow (100ml/h)	niedriger Flow (10ml/h)	niedriger Flow/ hohe Konzentration (10ml/h)
$\Delta PD$ SFS	11,0 mV	11,0 mV	5,0 mV	7,5 mV
$\Delta PD$ SFS(%)	100,0	77,8	50,0	47,22

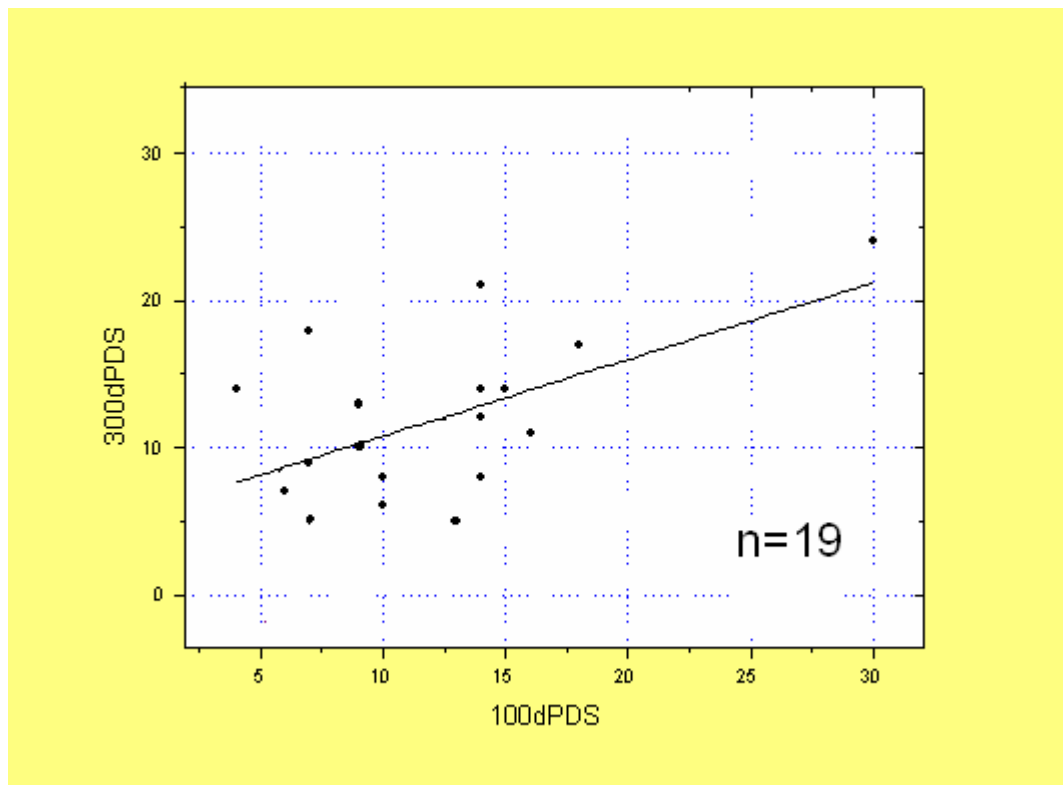
$\Delta PD$  bzw.  $\Delta PD(\%)$ = Veränderung der Potenzialdifferenz absolut bzw. prozentual



*Abb.3.6 Darstellung des absoluten Anstiegs der PD-Werte nach Superfusion von Salbutamol mit verschiedenen Flusstärken (Abkürzungen siehe Tab.3.5)*

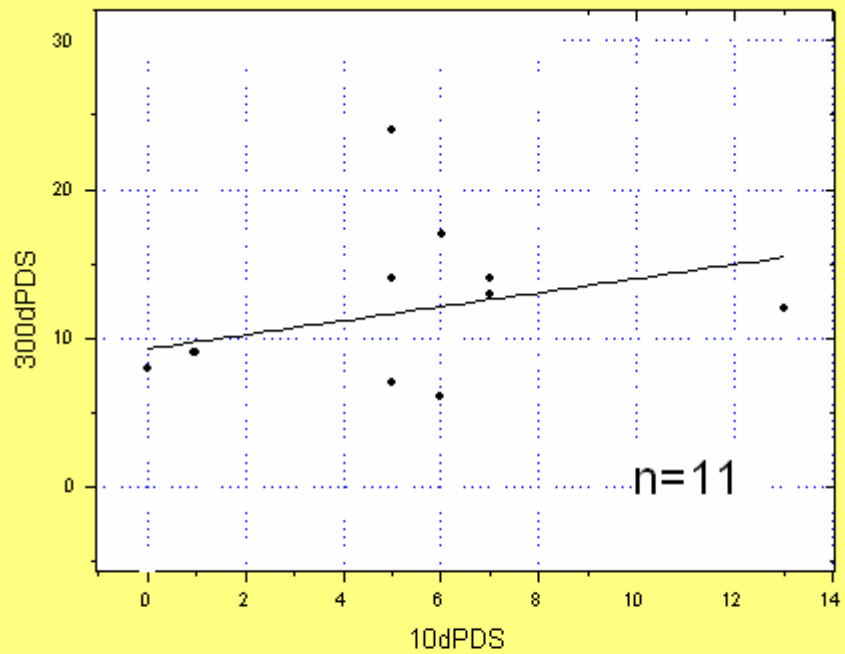
Im t-Test für abhängige Stichproben stellte sich bei einem Signifikanzniveau von  $p=0,017$  ( korr. 0,05:3) kein signifikanter Unterschied nach Applikation des Salbutamols zwischen den PD-Werten des hohen (300 ml/h) und des mittleren Flows (100 ml/h) dar ( $p=0,32$ ). Die PD- Werte, die mit dem niedrigen Flow (10 ml/h), sowohl mit normaler ( $p=0,001$ ), als auch 10fach erhöhter Medikamentendosis ( $p=0,009$ ) ermittelt wurden, wiesen allerdings einen signifikanten Unterschied im Vergleich zu den höheren Flüssen auf.

Um die Korrelation der hohen und der mittleren Flußstärken darzustellen, wurden sie gegeneinander auf eine Regressionsgeraden aufgetragen.



*Abb.3.7 Korrelation der PD-Werte von hohem und mittleren Fluss nach Salbutamolwirkung*

Es errechnete sich eine Korrelation von  $r=0,57$  bei einer Irrtumswahrscheinlichkeit von  $p<0,05$ . Trägt man die PD-Werte nach Salbutamolgabe mit dem hohen Flow gegen den niedrigen Flow mit und ohne erhöhte Konzentration der Superfusionslösungen auf eine Regressionsgeraden auf, zeigt sich in beiden Fällen eine signifikant schlechtere Korrelation (Abb. 3.8 und Abb. 3.9).



*Abb.3.8 Korrelation der PD-Werte von hohem und niedrigem Fluß mit normaler Konzentration der Superfusionslösungen nach Salbutamolwirkung*

Die Korrelation betrug  $r = 0,29$  bei einer Irrtumswahrscheinlichkeit von  $p = 0,18$ .

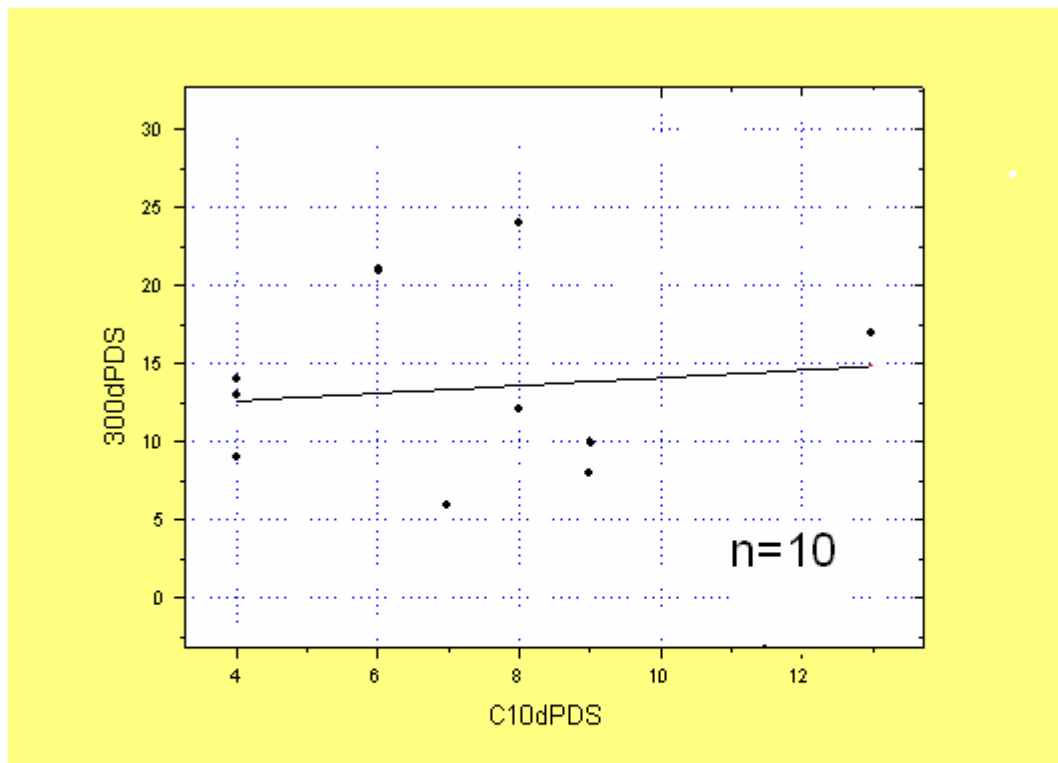


Abb.3.9 Korrelation von hohem und niedrigem Fluß mit hoher Konzentrati-der-*Superfusionslösungen nach Salbutamolwirkung*

Die Korrelation betrug  $r=0,12$  bei einer Irrtumswahrscheinlichkeit von  $p=0,36$ .

### **3.3 Vergleich von rektaler und nasaler Potenzialdifferenzmessung (PD) in vivo**

Ausgangswerte:

Bei 15 gesunden Probanden im Alter zwischen 4 und 61 Jahren (Median: 24,8 Jahre) und einem CF-Patienten (18 Jahre) wurden Potenzialdifferenzmessungen an der nasalen sowie an der rektalen Schleimhaut durchgeführt. Anschließend wurden nacheinander Amilorid und Salbutamol über je drei Minuten superfundiert und die jeweiligen PD Werte bestimmt (Tab. 3.8).

Beim Vergleich der individuellen nasalen bzw. rektalen Basiswerte (Tab. 3.8, Spalte 1 und 8) fanden sich zum Teil stark divergierende Ergebnisse, auch bei dem einzigen CF-Patienten, der sich zur Verfügung stellte.

Die deskriptive statistische Auswertung zeigte dennoch eine akzeptable Übereinstimmung. Der mediane PD-Basalwert betrug vor Superfusion bei nasaler Messung -22 mV, bei rektaler Messung -30 mV (Tab. 3.9). Daraus ist abzuleiten, dass sich rektal höhere Potentialdifferenzen messen lassen als nasal. Im t-Test für abhängige Stichproben war allerdings kein statistisch signifikanter Unterschied nachzuweisen ( $p = 0,5$ ; Abb. 3.8).



*Tabelle 3.8 : Resultate der Potenzialdifferenzmessung (PD) an der nasalen und rektalen Schleimhaut nach Superfusion (SF) von Amilorid (A) und Salbutamol (S) bei 15 gesunden Probanden und einem CF-Patienten*

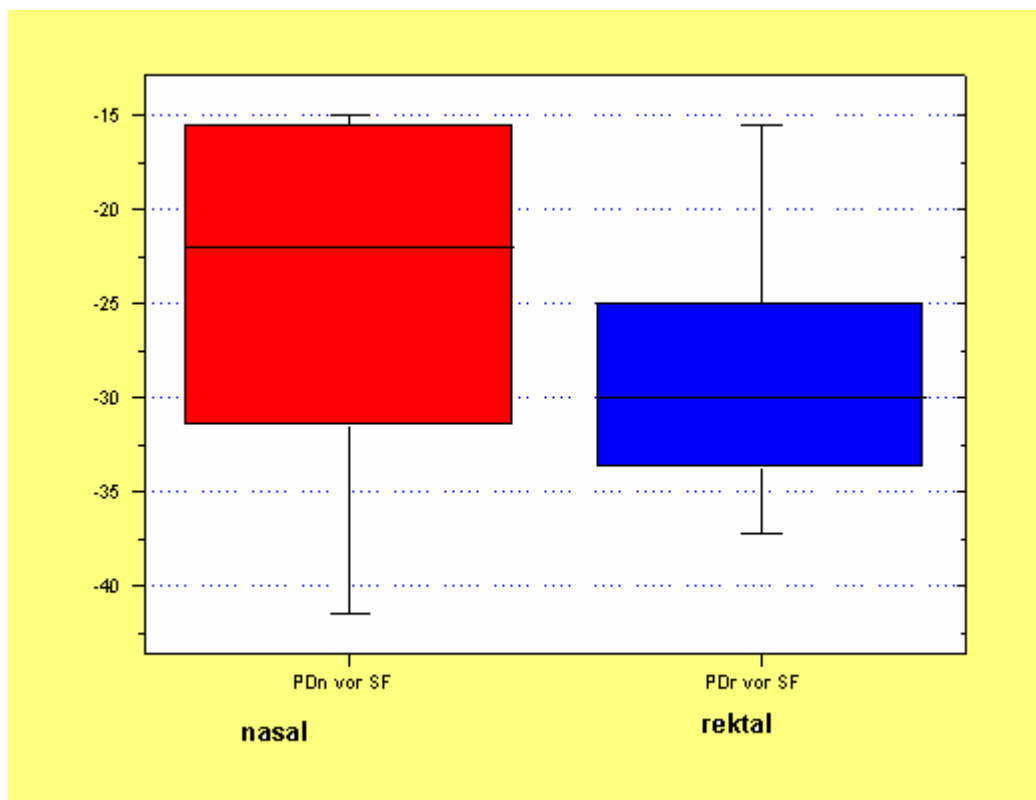
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
PDn vor SF	PDn nach SF A	$\Delta$ PDn nach SF A	$\Delta$ PDn nach SF A (%)	PDn nach SF S	$\Delta$ PDn nach SF S	$\Delta$ PDn nach SF S (%)	PDr vor SF	PDr nach SF A	$\Delta$ PDr nach SF A	$\Delta$ PDr nach SF A (%)	PDr nach SF S	$\Delta$ PDr nach SF S	$\Delta$ PDr nach SF S (%)
Nicht CF-Probanden													
-15	-7	8	53,3	-20	13	163	-33	-20	13	39,4	-30	10	76,9
-15	-5	10	66,7	-12	7	70	-28	-10	18	64,3	-24	14	77,8
-17	-8	9	52,9	-16	8	88,9	-35	-23	12	34,3	-35	12	100
-22	-6	16	72,7	-20	14	87,5	-20	-14	6	30	-18	4	66,7
-40	-14	26	65,0	-30	16	61,5	-25	10	35	140	-8	18	51,4
-39	-22	17	43,6	-37	15	88,2	-25	-13	12	48	-24	11	91,7
-17	-4	13	76,5	-13	9	69,2	-32	-21	11	34,4	-28	7	63,6
-42	-10	32	76,2	-47	37	116	-14	-8	6	42,9	-14	6	100
-27	-7	20	74,1	-19	12	60	-25	-14	11	44	-21	7	63,6
-22	-7	15	68,2	-27	20	133	-35	-15	20	57,1	-41	26	130
-33	-15	18	54,6	-24	9	50	-30	-15	15	50	-25	10	66,7
-15	-6	9	60,0	-13	7	77,8	-38	-27	11	29	-35	8	72,7
-15	-4	11	73,3	-22	18	164	-32	-20	12	37,5	-28	8	66,7
-21	-8	13	61,9	-24	16	123	-34	-5	29	85,3	-28	23	79,3
-27	-14	13	48,2	-21	7	53,9	-25	10	35	140	-10	20	57,1
CF-Patient													
-41	-20	21	51,2	-24	4	19,1	-20	-8	12	60	-10	2	16,7

$\Delta$ PD bzw.  $\Delta$ PD (%) = Differenz der PD absolut bzw. prozentual, r = rektal, n = nasal  
SF=Superfusion, A=Amilorid, S=Salbutamol

*Tabelle 3.9: Vergleich der Grundwerte von rektaler (r) und nasaler (n) Potenzialdifferenz (PD) vor Superfusion (SF) bei 15 gesunden Probanden*

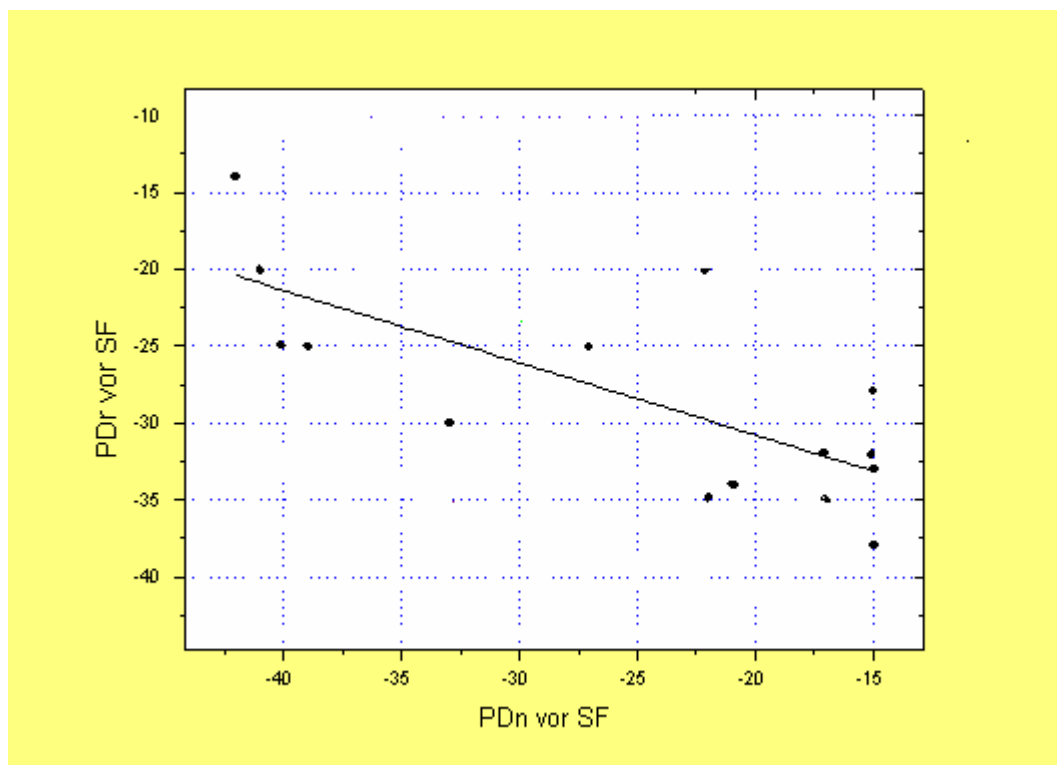
	nasaler Basalwert vor SF	rektaler Basalwert vor SF
Mittelwert	-24,5	-28,7
Standardabweichung	9,8	6,5
Median	-22	-30
Minimum	-42	-38
Maximum	-15	-14

$\Delta PD$  bzw.  $\Delta PD$  (%) = Differenz der PD absolut bzw. prozentual, r = rektal, n = nasal  
 SF=Superfusion, A=Amilorid, S=Salbutamol



*Abb. 3.8 Vergleich von nasaler und rektaler Potenzialdifferenz vor Superfusion dargestellt als Boxplot-Diagramm (n=15; p = 0,29)  
 Die Markierungen bedeuten Median, 25. und 75. sowie 5. und 95. Perzentile.  
 (Abkürzungen siehe Tab.3.5; n=nasal; r=rektal)*

Zum Vergleich der vor Superfusion nasal und rektal gemessenen PD-Werte wurde die lineare Regression berechnet. (Abb. 3.9).



*Abb.3.9 Lineare Regression zwischen rektalen und nasalen PD-Werten vor Superfusion (n=15,  $r=-0,73$ ,  $p=0,0006$ )*

Die Regressionsanalyse ergab eine negative Korrelation von  $r= -0,73$  bei einer Irrtumswahrscheinlichkeit von  $p= 0,001$ . Auch ist die Tendenz zu erkennen, dass höheren rektalen Ausgangswerten niedrigere nasale Ausgangswerte entsprechen.

### Werte nach Amilorid:

Auch bei dem Vergleich der rektalen und der nasalen PD-Werte nach Superfusion des Amilorids zeigten sich zum Teil stark divergierende Ergebnisse. Die deskriptive Statistik ergab aber eine akzeptable Übereinstimmung (Tab. 3.10).

Nach Applikation des Natriumkanalblockers sank die mittlere Potenzialdifferenz, nasal gemessen, um 12 mV auf -7 mV, das entspricht einem prozentualen Abfall von 65%.

Rektal ergab sich ein Abfall von durchschnittlich 13 mV auf -14 mV, prozentual ausgedrückt sank die Potenzialdifferenz um 44,0% (Tab. 3.10).

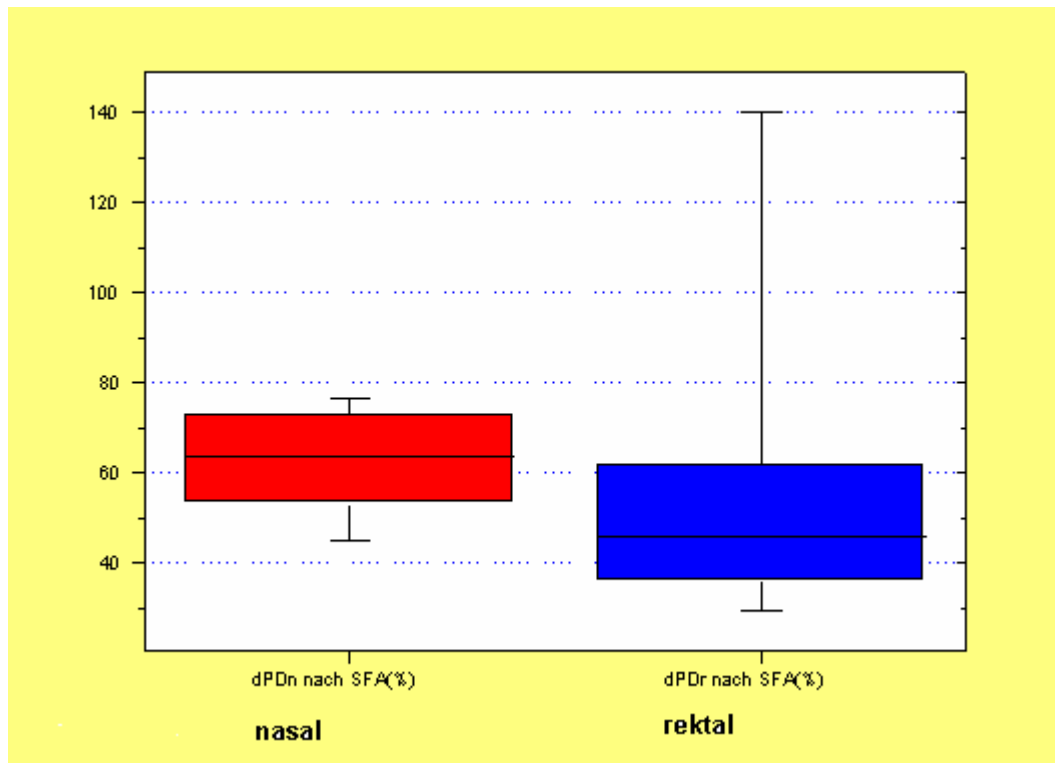
Dementsprechend ergab sich trotz einzelner größerer Differenzen zwischen den Absolutwerten eine weitgehend übereinstimmende Reaktion auf Amilorid ( $p = 0,39$  im paarigen t-Test).

Dies gilt auch für den CF-Patienten, bei dem das prozentuale Absinken der PD bei nasaler Messung 51,2%, bei rektaler Messung 60,0% betrug.

*Tabelle 3.10 : Vergleich der nasal und rektal gemessenen PD- Werte nach Superfusion von Amilorid*

	PDn SFA	PD <sub>r</sub> SFA	ΔPDn SFA	ΔPD <sub>r</sub> SFA	ΔPDn SFA (%)	ΔPD <sub>r</sub> SFA (%)
Fälle	15	15	15	15	15	15
Mittelwert	-9,1	-12,3	16,4	16	63,1	58,4
Standabw.	5,0	2,8	9,4	7,3	10,7	36,2
Median	-7	-14	12	13	65	44
Minimum	-22	-27	6	8	43,6	29
Maximum	-4	10	35	32	76,5	140

$\Delta PD$  bzw.  $\Delta PD$  (%) = Differenz der PD absolut bzw. prozentual,  $r$  = rektal,  $n$  = nasal  
SF=Superfusion, A=Amilorid, S=Salbutamol



*Abb. 3.10 Vergleich von nasaler und rektaler  $\Delta PD$  (%) nach Superfusion von Amilorid dargestellt als Boxplot-Diagramm ( $n=15$ )*

Die Regressionsanalyse ergab eine Korrelation von  $r = -0,26$  ( $p = 0,16$ ), die durch zwei auffällige Messwerte (jeweils + 10 mV, entsprechend  $\Delta PD$  von 140 %) beeinträchtigt wurde.

### PD nach einem $\beta$ -Sympathomimetikum:

Die diagnostische Aussagekraft der rektalen PD lässt sich am besten anhand der Reaktion auf ein  $\beta$ -Sympathomimetikum einschätzen. Die erfolgreiche Aktivierung der CF-typischen Chloridkanäle durch ein  $\beta$ -Sympathomimetikum ist kennzeichnend für Probanden ohne CF. Eine unzulängliche Stimulierbarkeit (PD-Anstieg < 50%) lässt auf eine Chlorionentransportstörung schließen, wie sie für CF-Patienten typisch ist.

Wie aus Tabelle 3.4 ersichtlich kam es bei allen gesunden Probanden, sowohl bei nasaler als auch bei rektaler Messung, zu einem deutlichen Anstieg der PD-Werte nach Superfusion des Salbutamols. Nasal ergab sich ein mittlerer Anstieg um 13,0 mV auf 21,0 mV, prozentual entspricht das einem mittleren Anstieg um 87,5 %.

Rektal wurde ein mittlerer Anstieg um 10,0 mV auf -25,0 mV gemessen. Prozentual ausgedrückt stieg die Potenzialdifferenz nach Gabe des Salbutamols um 72,7%, also ebenso eindeutig wie bei nasaler Messung.

Der einzige CF-Patient, bei dem die Messung durchgeführt werden konnte, zeigte sowohl rektal als auch nasal eine deutlich geringere Reaktion auf das  $\beta$ -Sympathomimetikum. Die PD stieg nasal um 3mV auf -24mV, das entspricht einem prozentualen Anstieg von 19,1%. Rektal erhöhte sich die PD um 2 mV auf -10 mV (= 16,7 %).

*Tabelle 3.11: Vergleich der nasal und rektal gemessenen PD-Werte (Potenzialdifferenz) nach Superfusion (SF) von Salbutamol (S), weitere Abkürzungen analog Tabelle 3.1*

	PDn SFS	PD <sub>r</sub> SFS	dPDn SFS	dPD <sub>r</sub> SFS	dPDn SFS (%)	dPD <sub>r</sub> SFS (%)
Fälle	15	15	15	15	15	15
Mittelwert	-23	-24,6	13,9	12,3	93,7	77,6
Standabw.	9,4	9,3	7,7	6,6	37,5	20,4
Median	-21	-25	13	10	87,5	72,7
Minimum	-47	-41	7	4	50	51,4
Maximum	-12	-8	37	26	163,6	130

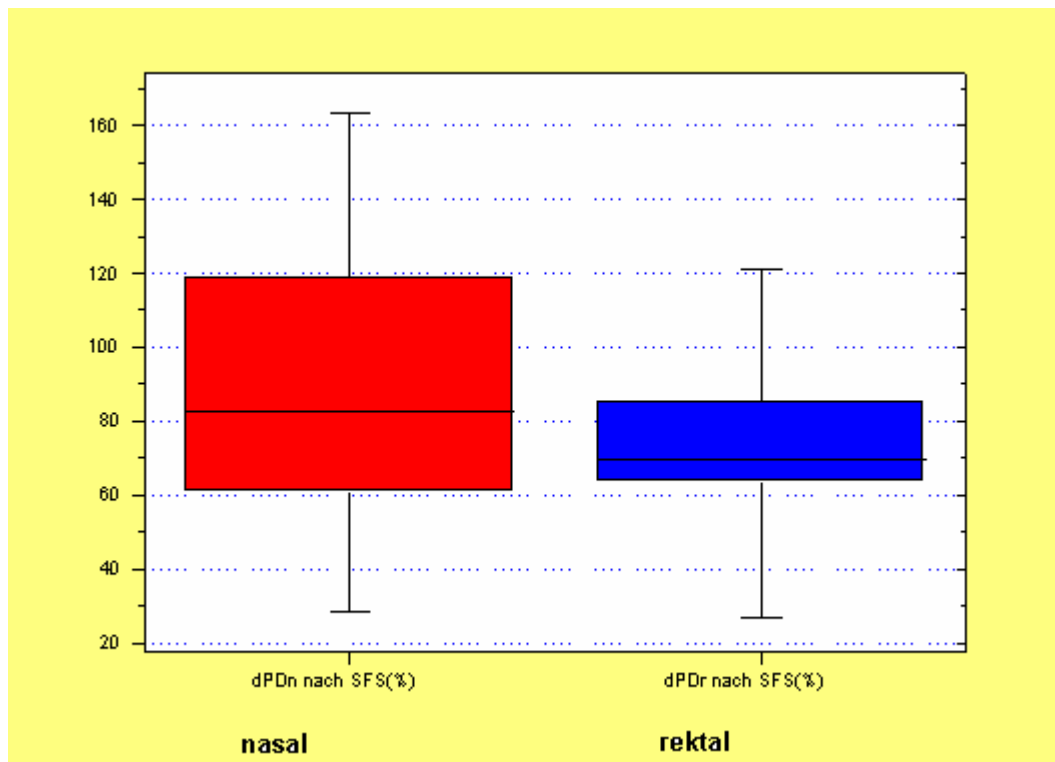
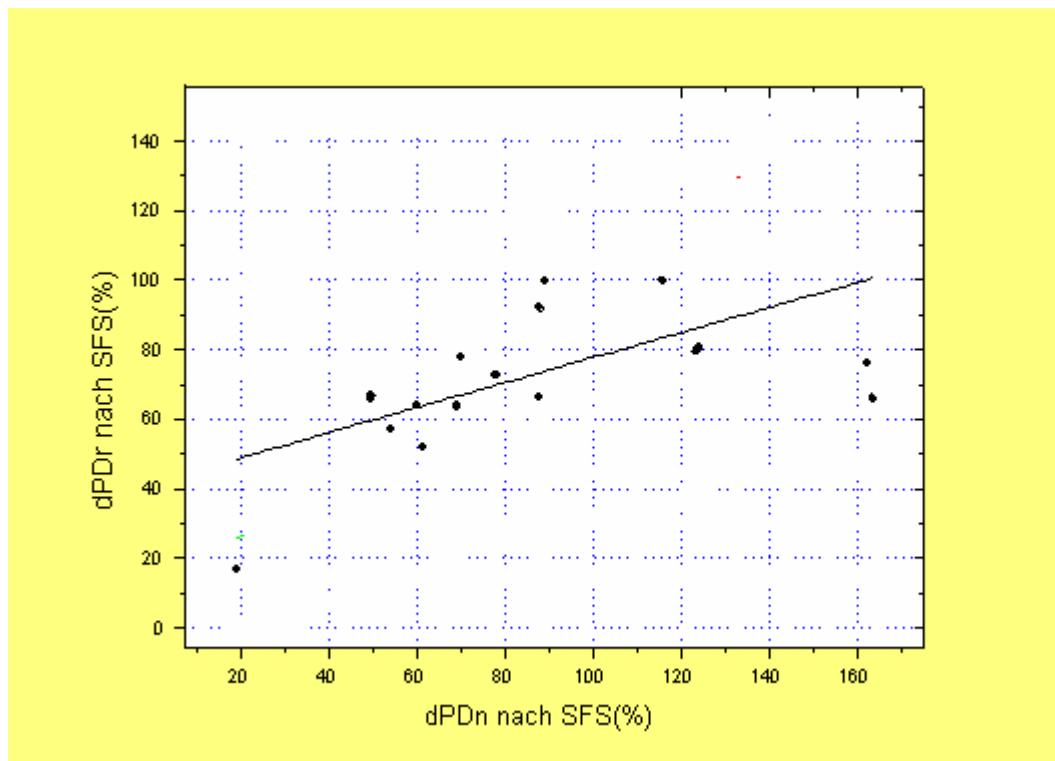


Abb. 3.11 Vergleich von rektaler und nasaler  $\Delta PD$  (%) nach Superfusion von Salbutamol dargestellt als Boxplot-Diagramm ( $n=15$ ;  $p = 0,08$ )

Im t-Test für abhängige Stichproben war sowohl für die Absolutwerte ( $p = 0,70$ ) als auch für die prozentualen Änderungen der PD ( $p = 0,08$ ) kein signifikanter Unterschied zu ermitteln.

Die Regressionsanalyse der prozentualen Veränderung der Potenzialdifferenz nach Applikation des Salbutamols mit beiden Methoden (Abb. 3.12) ergab eine Korrelation von  $r=0,61$  bei einer Irrtumswahrscheinlichkeit von  $p=0,08$ .



*Abb.3.12: Vergleich der rektalen und der nasalen PD-Werte nach Applikation des Salbutamols mit Hilfe einer Regressionsgeraden*

Der übereinstimmend deutliche Anstieg nach Salbutamolgabe lässt sich demnach mit beiden Methoden gleichermaßen darstellen.



## 4 Diskussion

### 4.1 Allgemeines zur Potenzialdifferenzmessung (PD)

Die transepitheliale Potenzialdifferenzmessung stellt neben dem Schweißtest und der Genanalyse ein wichtiges Mittel zur Diagnostik der Mukoviszidose dar. Bei eindeutiger Klinik (Schwere Lungenmanifestation, Pankreasinsuffizienz, Dystrophie), Nachweis von erhöhtem NaCl im Schweiß und zwei der bekannten Genmutationen, ist die Diagnose Mukoviszidose einfach zu stellen. Finden sich aber keine so eindeutigen Befunde, kann die Abgrenzung zwischen Mukoviszidose Patienten, Gesunden und anderen Patienten Schwierigkeiten bereiten.

Insbesondere bei den milden Verlaufsformen, die z.B. nur mit einer gastrointestinalen oder leichten pulmonalen Symptomatik verlaufen, ist eine Zuordnung oft schwierig [84].

Die Potenzialdifferenzmessung kann in solchen Fällen wichtige Hinweise auf das Vorliegen einer Mukoviszidose geben [85]. Mit der Superfusion verschiedener Lösungen kann man die für CF typische Chlorionentransportstörung nachweisen. Die Methode zeichnet sich durch eine hohe Sensivität und Spezifität aus. [23,48]

Wegen des komplizierten Messaufbaus und der aufwändigen Wartung ist die transepitheliale PD-Messung nur an wenigen CF-Zentren als Routinediagnostik etabliert. Es wäre daher wünschenswert, den Messaufbau sowie die Durchführung der Messung zu vereinfachen, damit auch kleinere Kliniken die Möglichkeit haben, die PD-Messung in der Routinediagnostik anzuwenden.

Auch in einer Situation, die in den nächsten Jahren an Bedeutung gewinnen wird, in denen sich unter Einfluss modulierender Gene das Krankheitsbild der CF entwickelt, ohne dass sich eine klassische CF-Mutation nachweisen lässt („CF like disease“), kann die PD-Messung hilfreich sein [86, 87,88].

## **4.2 Vergleich von direkt konnektierbaren Elektroden mit der konventionellen Methode bei der PD-Messung am Menschen**

Wie eingangs erwähnt, ist die transepitheliale Potenzialdifferenzmessung zur Zeit nur an wenigen CF-Zentren als Routinediagnostik etabliert. Als Gründe hierfür lassen sich der komplizierte Versuchsaufbau und die aufwendige Wartung der Messeinrichtung anführen.

Ein Anliegen der folgenden Arbeit war es daher, den Versuchsaufbau soweit zu vereinfachen, dass sich der Aufwand in erträglichen Grenzen hält.

Der konventionelle Versuchsaufbau bedient sich eines Systems aus Agargelbrücken, das regelmäßig überprüft und gewartet werden muss [68,69,84].

Die Möglichkeit, dieses komplizierte Agargelbrückensystem durch Elektroden zu ersetzen, die direkt in das Flusssystem eingeschaltet werden können, würde eine große Erleichterung bedeuten. Solche Elektroden wurden von WPI-Berlin entwickelt und zeichnen sich durch ein stabiles, reproduzierbares Potenzial aus. Als Vorteil der Gelbrücken ist deren kostengünstige Herstellung sowie deren relativ geringe Störanfälligkeit zu nennen.

Die vorgelegten Ergebnisse belegen, dass mit der konventionellen und mit den neuen, direkt konnektierbaren Elektroden exakt die gleichen Kurvenverläufe dargestellt werden konnten. Die mit den beiden Methoden erzielten PD-Werte stimmten vollständig überein (Abb 3.13). Demnach kann man die konventionelle Methode durch die neue ersetzen. Vorteil der direkt konnektierbaren Elektroden ist deren handliche Größe, die sehr einfache Handhabung und die kommerzielle Verfügbarkeit. Eine Einbuße an Sensivität und Spezifität ist nicht zu befürchten. Dieses Resultat stimmte mit den Erfahrungen einer Würzburger Arbeitsgruppe überein, die WPI- Elektroden im Rahmen eines pulmonologischen Praktikums bereits erfolgreich eingesetzt hatten, ohne allerdings einen Vergleich mit dem Gelbrückensystem zu haben [89].

Mit Hilfe der neuen, deutlich kleineren Elektroden, ließe sich sogar eine mobile Messeinrichtung zusammenstellen. Dies hätte vor allem bei der später diskutierten rektalen Messung, bei der die Säuglinge und Kleinkinder sediert und in das entsprechende Labor transportiert werden müssen, große Vorteile, da es mit einer mobilen Messeinrichtung möglich wäre, die Messung direkt am Krankenbett durchzuführen.

Ein weiterer positiver Aspekt stellt die sehr einfache Handhabung der Elektroden dar. Sie können direkt über das gebräuchliche Luer-Lock System in das Flusssystem eingeschaltet werden. Es ist nicht wie bei der herkömmlichen Methode notwendig, die Gelbrücken im Abstand von einigen Wochen bis Monaten selbst neu zu bauen. Die Wartung gestaltet sich ebenfalls sehr einfach, bei Nichtbenutzung müssen die Elektroden in KCl-Lösung eingelegt werden.

Als Nachteil ist die große Empfindlichkeit der Elektroden zu nennen. Während der Untersuchungen kam es mehrfach zu einem Abbrechen der Ag/AgCl-Elektrode, was zu einer Unterbrechung des Flusssystems führte und eine Fortführung der Messung unmöglich machte. Die Elektroden müssen sehr vorsichtig gehandhabt werden und dürfen keinen stärkeren Erschütterungen ausgesetzt werden. Weiterhin ist der finanzielle Aspekt zu betrachten. Die Elektroden sind zwar jederzeit kommerziell verfügbar, kosten aber ein Vielfaches mehr als die Eigenherstellung der Gelbrücken. Durch die hohe Empfindlichkeit müssen sie relativ häufig erneuert werden.

Es lässt sich folgendes Fazit ziehen: Die alte und neue Messvorrichtung sind in Bezug auf ihre Aussagekraft völlig gleichwertig. Vorteil der neuen Elektroden ist deren einfache Handhabung, die eine Verwendung der Potenzialdifferenzmessung in der Routinediagnostik erleichtert. Nachteilig sind die hohe Störanfälligkeit und die relativ hohen Kosten.

### **4.3 Vergleich der Wirkung verschiedener Flussstärken und Konzentrationen der Superfusionslösungen auf die nasale transepitheliale Potenzialdifferenz**

Ziel dieser Untersuchung war, die optimale Flussgeschwindigkeit bei der Superfusion zu ermitteln, die es noch erlaubt eine eindeutige Unterscheidung in krank und gesund zu treffen.

Üblicherweise werden die Medikamente bei der Superfusionsmessung mit einem Flow von 300 ml/h gefördert. [49,68,69]. In der vorliegenden Studie wurden langsamere Flussgeschwindigkeiten mit der gleichen Medikamentenkonzentration ( 100 ml/h und 10 ml/h) und ein langsamer Flow mit 10-fach höherer Konzentration der Lösungen untersucht.

Die Untersuchungsergebnisse lassen darauf schliessen, dass sowohl mit dem herkömmlichen hohen als auch dem mittleren Flow bei gesunden Probanden die erwartete Reaktion auf die Medikamente nachzuweisen war. (Tab. 3.3). Man kann also durchaus die mittlere Flussgeschwindigkeit mit 100 ml/h ohne Einbußen in der Aussagekraft der Messung verwenden.

Im Gegensatz dazu erlaubt die Verwendung des niedrigen Flows, sowohl mit normaler, als auch mit erhöhter Medikamentenkonzentration, keine so eindeutige Aussage.

Bei Verwendung des niedrigeren Flows zeigten mehrere nachgewiesenen gesunde Probanden keine adäquate Reaktion auf die Medikamente, insbesondere das  $\beta$ -Mimetikum (vgl. Abb. 3.7). Sie wären demnach bei einer Messung mit dem niedrigeren Flow fälschlicherweise als krank diagnostiziert worden.

Eine Verwendung der langsamen Flussgeschwindigkeit würde also zu gehäuft falsch positiven Ergebnissen führen, und ist deshalb nicht zu empfehlen. Auch konnte bei erhöhter Medikamentendosis mit dem niedrigen Flow kein ausreichend gutes Ergebnis erzielt werden (Tab.3.7). Diese Resultate sprechen

dafür, dass eine Minimalgeschwindigkeit vorhanden sein muss. Eine höhere Medikamentenkonzentration bei langsamerer Superfusion hat nicht denselben Effekt.

Hingegen erscheint es durchaus sinnvoll, die Flussgeschwindigkeit von 300 ml/h auf 100 ml/h zu reduzieren. Die Verwendung des mittleren Flows würde in der Routinediagnostik zu einer deutlichen Einsparung an Medikamenten führen, ohne dass die Aussagekraft beeinträchtigt wird. Darüber hinaus ist die Messung für den Patienten wesentlich angenehmer, da nur noch ein Drittel der Lösungen nasal appliziert werden muss. Das Risiko der Bildung von Flüssigkeitsansammlungen ist reduziert. Die Gefahr, dass es aus diesem Grund zu Fehlmessungen kommt, ist wesentlich geringer.

Es lässt sich folgendes Fazit ziehen: Die Reduzierung des Flows auf 100 ml/h würde eine Verbesserung der Messung darstellen. Die Verwendung eines noch niedrigeren Flows erscheint nicht sinnvoll, da darunter die Aussagekraft der Messung leiden würde.

#### **4.4 Direktvergleich der nasalen und der rektalen PD-Messung**

Zur Zeit wird die transepitheliale Potenzialdifferenzmessung überwiegend an der Nasalschleimhaut durchgeführt [48]. Dies ist zur Bestimmung der Basalwerte prinzipiell zwar auch bei Säuglingen und Kleinkindern möglich, die wesentlich aussagekräftigere Superfusionsmethode kann dagegen aus verschiedenen Gründen erst bei Kindern ab ca. 6 Jahren durchgeführt werden. Der wichtigste Grund hierfür stellt die Compliance der kleinen Patienten dar. Sie müssen, damit das Messprotokoll richtig beurteilt werden kann, für mindestens 6 Minuten absolut still halten, während die Superfusionslösungen über einen Katheter in die Nase perfundiert werden. Die Erfahrung zeigt, dass dies bei Kindern unter 6 Jahren nur äußerst selten zu bewerkstelligen ist.

Prinzipiell wäre es möglich, die Messung unter Sedierung durchzuführen. Dies ist aber aufgrund der Aspirationsgefahr zu gefährlich.

Um die Superfusionsmethode auch schon bei Säuglingen und Kleinkindern durchführen zu können, wurde die PD-Messung an der Rektalschleimhaut eingeführt. Dies erlaubt schon bei Säuglingen und Kleinkindern, die wesentlich ausagekräftigere Superfusionsmethode anzuwenden.

Unruhige Kinder können vor der Messung problemlos sediert werden.

Wie bei der nasalen Messung sollte die Schleimhaut nicht entzündet sein, und der Darminhalt vor der Messung abgeführt werden [72,73,74].

In der vorliegenden Arbeit wurde erstmals ein Direktvergleich der nasalen und der rektalen Messung bei 15 gesunden Probanden und einem CF-Patienten vorgenommen. Bei allen gesunden Probanden konnte sowohl nasal als auch rektal ein Wiederanstieg der PD-Werte nach Salbutamolgabe unter Natriumblockade durch Amilorid um mindestens 50% beobachtet werden. Dieser Anstieg fehlte bei dem CF-Patienten mit beiden Methoden.

Damit ließ sich eine eindeutige Zuordnung in CF- und Nicht-CF Patienten vornehmen.

Betrachtet man sich die einzelnen Kurvenverläufe, so wird deutlich, dass nasal und rektal nicht die gleichen Ausgangswerte bzw. Kurvenverläufe zu finden sind. Insbesondere die negative Korrelation der nasal und rektal gemessenen Ausgangswerte bzw. der Werte nach Amilorid bestätigen diese Divergenz. Woher die Divergenzen kommen, ist unklar. Eine Rolle könnten die unterschiedlichen Epithelien spielen. Während sich unter der Concha nasalis inferior Flimmerepithel befindet, misst man bei der rektalen PD am Plattenepithel der Darmschleimhaut. Insgesamt sind die Epithelien aber nach einem einheitlichen Struktur- und Funktionsprinzip aufgebaut, welches die Durchführung beider Methoden ermöglicht [90]. Entscheidend ist, dass es mit beiden Methoden zu einem deutlichen Abfall der Werte nach Superfusion des Amilorids kommt.

Richtet man das Augenmerk auf die Repolarisation nach Superfusion des  $\beta$ -Sympathomimetikums, zeigte sich hier eine gute Korrelation der nasal und der rektal ermittelten Werte. Bei allen gesunden Probanden zeigte sich sowohl nasal, als auch rektal ein deutlicher Wiederanstieg der PD-Werte von mindestens 50%. Bei dem einzigen CF-Patienten, der sich für beide Messungen zur Verfügung stellte, fehlte die Reaktion auf das  $\beta$ -Sympathomimetikum ebenso eindeutig.

Da PD-Messungen in vitro am Darmbiopsat zur etablierten Diagnostik gehören [46,47,91,92], bietet es sich an, die Messergebnisse in vitro mit solchen, die in vivo bestimmt werden, zu vergleichen. Ein solches Projekt scheiterte bisher am zu großen gerätetechnischen Aufwand der PD-Messung.

Auch jetzt wird man die Möglichkeit einer rektalen PD-Bestimmung bei Säuglingen und Kleinkindern mit der Superfusionsmethode bereits nutzen.

Insbesondere bei atypischen Verläufen, kann die PD-Messung schon bei sehr kleinen Patienten mithelfen, die Diagnose Mukoviszidose zu erhärten oder auszuschließen. Verlässliche Aussagen über die Sensivität und Spezifität sind zum jetzigen Zeitpunkt allerdings noch nicht möglich. Weitere Messungen an Patienten sind dringend zu fordern.

## 5 Zusammenfassung

### Hintergrund:

Die Messung der transepithelialen Potenzialdifferenz (PD) stellt ein wichtiges Hilfsmittel im Rahmen der Mukoviszidosedagnostik- und Forschung dar.

Zur Zeit wird die transepitheliale Potenzialdifferenzmessung nur an wenigen Mukoviszidose-Zentren durchgeführt. Gründe hierfür sind der komplizierte Versuchsaufbau und die aufwändige Wartung. Ziel der vorliegenden Arbeit war es, den Versuchsaufbau und den Messvorgang zu vereinfachen. Ferner sollte geklärt werden, ob die PD-Messung an der Rektalschleimhaut ebenso aussagekräftig ist wie die nasale Messung.

### Methodik:

1) Der konventionelle Versuchsaufbau, bestehend aus einem kompliziert aufgebauten System aus Agargelbrücken, wurde durch kommerziell erwerbzbare, direkt in das Flusssystem einschaltbare Ag/AgCl - Elektroden ersetzt. Mit beiden Geräten wurden bei je 15 CF-Patienten und 34 gesunden Probanden (12 - 61 J.) Potenzialdifferenzmessungen durchgeführt.

2) Mit dem Ziel der Vereinfachung der Messung wurde untersucht, mit welcher Flussgeschwindigkeit die Lösungen appliziert werden müssen, damit eine eindeutige Unterscheidung in CF- Patienten und Gesunde gewährleistet wird. Hierzu wurden bei 19 gesunden Probanden im Alter von 22 - 62 Jahren Messungen mit dem herkömmlichen hohen Flow (300 ml/h) und einem mittleren Flow (100ml/h) durchgeführt. Bei 11 dieser Probanden wurde mit einem niedrigen Flow (10 ml/h), bei 10 Probanden mit einem niedrigen Flow (10 ml/h) und 10fach erhöhter Medikamentenkonzentration gemessen.

3) In einem randomisierten Paarvergleich an 14 gesunden Probanden im Alter



zwischen 10 und 61 Jahren und einem CF-Patienten (18 J.) wurden PD-Messungen an der Nasal- und Rektalschleimhaut durchgeführt und direkt miteinander verglichen.

### **Ergebnisse:**

- 1) Mit beiden Methoden konnten exakt die gleichen Kurvenverläufe registriert werden. Die Korrelation betrug 1,0 und war somit hochsignifikant ( $p < 0,0001$ ). Aufgrund der Kurvenverläufe war mit beiden Methoden eine eindeutige Unterscheidung in Chlorionentransportstörung bei CF und regelrechtem Chlorionentransport bei Nicht-CF-Probanden möglich.
- 2) Bei der Untersuchung der Flussgeschwindigkeiten der verwendeten Lösungen zeigte sich sowohl mit dem hohen, als auch mit dem mittleren Flow ein eindeutiger Anstieg der PD nach Superfusion des verwendeten  $\beta$ -Mimetikums ( $> 50\%$ ). Die Korrelation war mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit von 0,05 signifikant. Mit den beiden niedrigen Flussgeschwindigkeiten (10ml/h) mit normaler und erhöhter Medikamentenkonzentration war ein deutlich niedrigerer Anstieg nachzuweisen und somit eine eindeutige Unterscheidung in CF-Patienten und Nicht-CF Probanden nicht gewährleistet.
- 3) Beim Vergleich der rektalen mit der nasalen PD zeigte sich übereinstimmend ein regelrechter Ionentransport mit einem Wiederanstieg von  $> 50\%$  nach der Stimulation mit einem  $\beta$ -Mimetikum. Er betrug für die rektale Messung durchschnittlich 77,8%, für die nasale Messung im Mittel 93,7%. Bei dem CF-Patienten konnte eine Repolarisation mit beiden Methoden nicht nachgewiesen werden. Es zeigte sich eine signifikante Korrelation der beiden Methoden ( $p < 0,08$ ).

**Fazit:**

- 1) Die Verwendung von direkt in das Durchflusssystem einschaltbaren Elektroden vereinfacht den Versuchsaufbau der Potenzialdifferenzmessung und ist für die Anwendung in der Routinediagnostik geeignet. Die diagnostische Aussagekraft ist mit beiden Methoden gleichwertig.
- 2) Die Verwendung einer mittleren Flussgeschwindigkeit von 100 ml/h zur Applikation der Medikamentenlösungen bei der Potenzialdifferenzmessung ist praktikabler als ein hoher Fluss von 300 ml/h und beeinträchtigt die diagnostische Aussagekraft der Messung nicht. Eine Verwendung noch niedrigerer Flussgeschwindigkeiten ist ohne Einbußen der Aussagekraft nicht möglich.
- 3) Die transepitheliale Potenzialdifferenz ist rektal messbar und zeigt weitgehend übereinstimmende Ergebnisse mit den nasal erhobenen Befunden.

Das Ziel der Arbeit, die PD-Messung zu vereinfachen und einer breiteren Anwendung den Weg zu bahnen, wurde somit realisiert.

## 6 Summary

### **Background:**

The measurement of the potential difference (PD) is an important tool in diagnosis and research of cystic fibrosis. At the moment PD can be only measured by a few working groups, specialized in cystic fibrosis. The reason is a sophisticated device, which is not commercially available. One aim of this thesis was to simplify the construction of the device and the procedure of the measurement. Another aim was to compare the reliability of the findings of nasal PD with those of rectal PD.

### **Methods:**

1) The conventional construction of the device, consisting of a complicated system of agar gel bridges was compared with small Ag/AgCl electrodes, directly connected to the flow system. PD was measured with both devices in 34 healthy and 15 cystic fibrosis patients (12 to 61years).

2) Measurements of the PD with a high (300ml/h), moderate (100ml/h) and low flow (10 ml/h) were performed in 19 healthy subjects (22 to 62 years). The aim was to find out, which flow rate of the solution is necessary to distinguish between CF- patients and Non-CF subjects.

Nasal PD was measured in 19 subjects using a high and a moderate flow. In addition in 11 subjects a low flow was applied without and with increased drug concentration.

3) In 15 Non-CF (10 to 61 years) and 1 CF patient (18 years) the findings of rectal PD were compared with those determined using nasal measurements.

**Results:**

1) Comparison of the PD measured with both devices showed similar values ( $r=1,0$  ,  $p < 0,0001$ ). Both methods enabled a clear separation between impaired activation of chloride channels in CF-patients and a regular chloride secretion in healthy subjects.

2) The increase of PD after superfusion with a beta-mimetic drug documented similar with moderate and high flow measurements and a significantly lower increase of PD using low flow superfusion with unchanged drug or with higher concentration. The response of PD after superfusion of the beta-mimetic drug showed a significant correlation between high and moderate flow ( $p= 0,05$ ).

3) Comparison of rectal and nasal PD measurements during superfusion of beta-mimetic drug in 15 Non-CF-controls and 1 CF- patient showed significant correlation ( $p < 0,08$ ). The increase of PD after superfusion with a beta-mimetic drug was 77,6% for the rectal and 93,7% for the nasal PD measurement. With both methods a distinct separation in defective chloride secretion in cystic fibrosis and regular chloride secretion in Non-CF subjects was possible.

**Conclusion:**

1) A simplification of PD measurement using electrodes which are directly connectable with the flow-through system represents an easier management of the device and does not impair the diagnostic value of in vivo PD measured by means of the superfusion method.

2) Using a flow of 100 ml/h appeared more practical. The conventional device using a high flow superfusion of drugs (300 ml/h) showed no advantage. A moderate or high flow, not low flow, is suitable to verify a regular CFTR-dependent chloride secretion in Non-CF subjects.

3) The rectal measurement of the potential difference is possible. The findings were congruent to those determined with nasal measurement.

## 7 Literatur

**[1] ROSENSTEIN, B.J., LANGBAUM, TS.:** Diagnosis. In: Taussig, L.M.: Cystic fibrosis. Thieme-Stratton Inc., Stuttgart, New York, 85-114 (1984)

**[2] ROSENSTEIN, B.J., LEVINE, J., LANGBAUM, TS., KENNEDY, T.:** Cystic fibrosis in adults: delayed diagnosis in three siblings, South Med. J., Mar. 79 319-322 (1986)

**[3] WAINRIGHT, B.J., SCAMBLER, P.J., SCHMIDTKE, J., WATSON, E.A., LAW HAI-YANG, FAVAL, M., COOKE, H.j., EIBERG, H., WILLIAMSON, R.:** Location of cystic fibrosis locus to human chromosome 7cen-q22. Nature 318: 384-385 (1985)

**[4] RIORDAN, J.R., ROMMENS, J.M., KEREM, B.S., ALON, N., ROZMAHEL, R., GRZELCZAK, Z., LOK, S., PLAVSIC, N., CHOU, J.L., DRUMM, M.L., IANUZZI, M.C., COLLINS, F.S. TSUI, L.C.:** Identification of the cystic fibrosis gene: cloning and characterization of complementary DNA. Science 245: 1066-1073 (1989)

**[5] ROMMENS, J.M., IANUZZI, M.C., KEREM, B.S., DRUMM, M.L., MELMER, G., DEAN, M., ROZMAHEL, R., COLE, J.L., KENNEDY, D., HIDAKA, N., ZSIGA, M., BUCHWALD, M., RIORDAN, J.R., TSUI, L.C., COLLINS, F.S.:** Identification of the cystic fibrosis gene: chromosome walking and jumping. Science 245: 1059-1065 (1989)

- [6] KEREM, B.S., ROMMENS, J.M., BUCHANAN, J.A., MARKIEWICZ, D., COX, T.K., CHAKRAVARTI, A., BUCHWALD, M., TSUI, L.C.: Identification of the cystic fibrosis gene: genetic analysis. Science 245: 1073-1080 (1989)
- [7] LINDEMANN, H., TÜMMLER, B., DOCKTER, G.: Mukoviszidose – Zystische Fibrose. 4. Aufl., Thieme Stuttgart-New York 2004
- [8] ZIELENSKI, J., TSUI, L.C.: Cystic fibrosis: genotypic and phenotypic variations. Annu. Rev. Genet. 29: 777-807 (1995)
- [9] ZIELENSKI, J.: Genotype and phenotype in cystic fibrosis. Respiration 67: 117-33 (2000)
- [10] Galatti, S.: Molekularbiologische Methoden für den Mutationsnachweis. In: Reinhardt, D., Götz, M., Kraemer, R., Schöni, M.H., Cystische Fibrose, Springer, Berlin 2003, 214-215
- [11] KEREM, E., COREY, M., KEREM, B.-S., ROMMENS, J., MARKIEWICZ, D., LEVISON, H., TSUI, L.-C., DURIE, P.: The relation between genotype and phenotype in cystic fibrosis - analysis of the most common mutation ( $\Delta F508$ ). New Engl. J. Med. 323: 1517-1522 (1990)
- [12] SUPER, M.: Milestones in cystic fibrosis. Brit. Med. Bulletin 48: 717-737 (1992)
- [13] FRÖMTER, E.: Die Ionentransportstörung bei der Mukoviszidose. Aktueller Wissensstand. Pneumologie 44: 1144-1146 (1990)

- [14] **TABCHARANI, J.A., ROMMENS, J.M., HOU, Y.X., CHANG, X.B., TSUI, L.C., RIORDAN, J.R., HANDRAHAN, J.W.:** Multi-ion pore behaviour in the CFTR chlorid channel. *Nature* 366: 79-82 (1993)
- [15] **GIBSON, L.E., COOKE, R.E.:** A test for concentration of electrolytes in sweat in cystic fibrosis of the pancreas utilizing pilocarpine by electrophoresis. *Pediatrics* 23: 545-549 (1959)
- [16] **BIJAM, J., FRÖMTER, E.:** Direct demonstration of high transepithelial chloride conductance in normal human sweat duct which is absent in cystic fibrosis. *Pflügers Arch.* 407: 123-127 (1986)
- [17] **BIJMAN, J., QUINTON, P.:** Permeability properties of cell membranes and tight junctions of normal and cystic fibrosis sweat ducts. *Pflügers Arch.* 408: 505-510 (1987)
- [18] **KNOWLES, M., STUTTS, M.J., SPOCK, A., FISCHER, N., GATZY, J.T., BOUCHER, R.C.:** Abnormal ion permeation through cystic fibrosis respiratory epithelium. *Science* 221: 1067-1069 (1983)
- [19] **REDDY, M.M., QUINTON, P.M.:** Localisation of Cl-conductance in normal and Cl-impermeability in cystic fibrosis sweat duct epithelium. *Am. J. Physiol.* 257: C727-C735 (1989)
- [20] **DELMARCO, A., PRADAL, U., CABRINI, G., BONIZZATO, A., MASTELLA, G.:** Nasal potential difference in cystic fibrosis patients presenting borderline sweat test. *Eur. Respir. J.* 10: 1145-1149 (1997)

**[21] HIGHSMITH, W.E., BURCH, L.H., ZHOU, Z., OLSEN, J.C., BOAT, T.E., SPOCK, A., GORVOY, J.D., QUITTELL, L., FRIEDMAN, K.J., SILVERMAN, L.M., BOUCHER, R.C., KNOWLES, M.R.:** A novel mutation in the cystic fibrosis gene in patients with pulmonary disease but normal sweat chloride concentration. *N. Engl. J. Med.* 331: 974-980 (1994)

**[22] WHEELER, W.B., COLTON, H.R.:** Cystic fibrosis: current approach to diagnosis and management. *Pediatr. Rev.* 9: 241-248 (1988)

**[23] SCHÜLER, D. , SEMET-GAUDELUS, I., WILSCHANSKI, I., BALLMANN, M., DECHAU-EDELMANN, A., HUG, M., LEAL, T., LEBACQ, J., LENOIR, G., STANKE WALLEMACQ,P., TÜMMLER, B., KNOWLES, M.R.:** Basic protocol for transepithelial nasal potential difference measurement. *J. Cyst. Fibros.* 3: 151-155, European Thematic Network for Cystic Fibrosis (2004)

**[24] KNOWLES, M., STUTTS, M.j., YANKASKAS, J.R., GATZY, J.T., BOUCHER, R.C.:** Abnormal respiratory epithelial ion transport in cystic fibrosis. *Clin. Chest Med.* 7: 285-297 (1986)

**[25] BOUCHER, R.C.:** Human airway ion transport. Part one. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 150: 271-281 (1994)

**[26] BOUCHER, R.C.:** Human airway ion transport. Part two. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 150: 581-593 (1994)

**[27] ANDERSON, M.P., RICH, D.P., GREGORY, R.J., SMITH, A.E., WELSH, M.J.:** Generation of cAMP-activated chloride currents by expression of CFTR. *Science* 251: 679-682 (1991)



- [28] **DERIDAS, S., GUGGINO, W.B:** CFTR: Domains, structure and function. *J. Bionerg. Biomembr.* 29: 443 (1993)
- [29] **JENTSCH, T.J., GÜNTHER, W:** Chloride channels: an emerging molecular picture. *Bio. Essay* 19: 117-126 (1997)
- [30] **SCHWIEBERT, E.M., BENOS, D.J., EGAN, M.E., STUTTS, M.J., GUGGINO, W.B:** CFTR is a conductance regulator as well as a chloride channel. *Physiol. Rev.* 79: 145-66 (1999)
- [31] **BOUCHER, R.C., KNOWLES, M.R., STUTTS, M.J., GATZY, J.T.:** Epithelial dysfunction in cystic fibrosis lung disease. *Lung* 161: 1-17 (1983)
- [32] **KNOWLES, M., GATZY, J., BOUCHER, R.:** Relative ion permeability of normal and cystic fibrosis nasal epithelium. *J. Clin. Invest.* 71: 1410-1417 (1983)
- [33] **BOUCHER, R.C., STUTTS, M.J., KNOWLES, M.R., CANTLEY, L., GATZY, J.T.:** Na<sup>+</sup> transport in cystic fibrosis respiratory epithelia. *J. Clin. Invest.* 78: 1245-1252 (1986)
- [34] **JIANG, C., FINKBEINER, W.E., WIDDICOMBE, J.H., McCRAY P.B. Jr., MILLER, S.S.:** Altered fluid transport across airway epithelium in cystic fibrosis. *Science* 262: 424-427 (1993)
- [35] **SMITH, J.J., KARP, P.H., WELSH, M.J.:** Defective fluid transport by cystic fibrosis airway epithelia. *J. Clin. Inv.* 93: 1307-1311 (1994)
- [36] **WELSH, M.J., SMITH, A.E.:** Molecular mechanisms of CFTR chloride channel dysfunction in cystic fibrosis. *Cell* 73: 1251-1254 (1993)

**[37] ANDERSON, M.P., WELSH, M.J.:** Calcium and cAMP activate different chloride channels in the apical membrane of normal and cystic fibrosis epithelia. Proc. Natl. Acad. Sci. 88: 6003-6007 (1991)

**[38] WELSH, M.J., TSUI, L., BOAT, T.F., BEAUDET, A.L.:** Cystic fibrosis. In: Scriver, C.R., Beaudet, A.L., Sly, W.S., Valle, D., Stanbury, J.B., Wyngaarden, J.B. and Frederickson, D.S., editors. The metabolic and molecular bases of inherited disease. McGraw-Hill, New York 1995, p. 3799-3876

**[39] WEBER, K., BARTH, C., SCHÜLER, D., BITTNER-DERSCH, P., PABST, J., GEIDEL, C., HÜLS, G., LINDEMANN, H.:** Zum Einfluß von Tiotropium auf die nasale transepitheliale Potentialdifferenzmessung. Atemw.-Lungenkrkh. 30, 38-42 (2004)

**[40] LINDEMANN, H.:** Pulmonaler Verlauf der Mukoviszidose beim Kind. Atemw.- Lungenkrkh. 19: 503-509 (1993)

**[41] USSING H.H., ZERAHN, K.:** Active transport of sodium as the source of electric current in the shortcircuited isolated frog skin. Acta physiol. Scand. 23: 112-127 (1950)

**[42] LASSEN, U.V., RASMISSEN, B.E.:** Use of microelectrodes for measurement of membrane potentials. In: Giebish, G.: Membrane transport in biology, Berlin 1978, 169-203

- [43] KNOWLES, M., BUNTIN, W.H., BROMBERG, P., GATZY, J.T., BOUCHER, R.C.:** Measurement of transepithelial electric potential difference in the trachea and bronchi of human subjects in vivo. Am. Rev. Respir. Dis. 126: 108-112 (1982)
- [44] KNOWLES, M., GATZY, J., BOUCHER, R.:** Increased bioelectric potential difference across respiratory epithelia in cystic fibrosis. N. Engl. J. Med. 305: 1489-1495 (1981)
- [45] ÜNAL-MAELGER, Ö.H., URBANEK, R.:** Stellenwert der Messung der transepithelialen Potentialdifferenz (PD) am respiratorischen Epithel in der Mukoviszidose-Diagnostik. Monatsschr. Kinderheilkd. 136: 76-80 (1988)
- [46] BALLKE, E.H.:** Die transepitheliale elektrische Potentialdifferenz (tPd) der respiratorischen und gastrointestinalen Schleimhaut im Kindesalter. Diss. Univ. Greifswald 1990
- [47] VEEZE, H.J., SINAASAPPEL, M., BIJMAN, J., BOUQUET, J., DE JONGE, H.R.:** Ion transport abnormalities in rectal suction biopsies from children with cystic fibrosis. Gastroenterology 101: 398-403 (1991)
- [48] AG GESELLSCHAFT FÜR PÄDIATRISCHE PNEUMOLOGIE: LINDEMANN H., SCHÜLER D., BALLMANN M., HEBESTREIT A., HOFMANN T., KERSTING U., MALL M., REINHARDT D.:** Klinischer Stellenwert der modernen elektrophysiologischen Diagnostik bei Mukoviszidose (zystische Fibrose). Monatsschr. Kinderheilkd. 149: 258-264 (2001)

- [49] KNOWLES, M., CARSON, J.L., COLLIER, A.M., GATZY, J.T., BOUCHER, R.C.:** Measurement of nasal transepithelial electric potential differences in normal human subjects in vivo. *Am. Rev. Respir. Dis.* 124: 484-490 (1981)
- [50] COGSWELL, J.J., REIDON, R.A., TAYLOR, B.:** Supportive lung disease in sisters mimicking cystic fibrosis. *Arch. Dis. Child.* 49: 520 (1974)
- [51] KNOWLES, M.R., MURRAY, G.F., SHALLAL, J.A., GATZY, J.T., BOUCHER, R.C.:** Bioelectric properties and ion transport in excised human bronchi. *Physiologist* 23: 100 (1980)
- [52] KLEYMAN, T.R., CRAGOE, E.J.:** Amiloride and its analogs as tools in the study of the ion transport. *J. Membrane Biol.* 105: 1-21 (1988)
- [53] LINDEMANN, H.:** Amiloridinhalation. *Pneumologie* 50: 841-844 (1996)
- [54] BOWLER, I.M., KELMAN, B., WORTHINGTON, D., LITTLEWOOD, J.M., WATSON, A., CONWAY, S.P., SMYE, S.W., JAMES, S.L., SHELDON, T.A.:** Nebulized amiloride in respiratory exacerbations of cystic fibrosis: a randomised controlled trial. *Arch. Dis. Child.* 73: 427-430 (1995)
- [55] HOFMANN, T., STUTTS, M.J., ZIERSCH, A., RÜCKES, C., WEBER, M., KNOWLES, M.R., LINDEMANN, H., BOUCHER, R.C.:** Effects of topically delivered benzamil and amiloride on nasal potential difference in cystic fibrosis. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 157: 1844-1849 (1998)

**[56] KNOWLES, M., CHURCH, N.L., WALTNER, W.E., YANKASKAS, J.R., GILLIGAN, P., KING, M., EDWARDS, L., HELMS, R.W., BOUCHER, R.:** A pilot study of aerosolized amiloride for the treatment of lung disease in cystic fibrosis. *N. Engl. J. Med.* 322: 1189-1194 (1990)

**[57] MIDDLETON, P.G., GEDDES, D.M., ALTON, E.W.F.W.:** Effect of amiloride and saline on nasal mucociliary clearance and potential difference in cystic fibrosis and normal subjects. *Thorax* 48: 812-816 (1993)

**[58] SAUDER, R.A., CHESROWN, S.E., LOUGHLIN, G.M.:** Clinical application of transepithelial potential difference measurements in cystic fibrosis. *J. Pediatr.* 111: 353-358 (1987)

**[59] STEWART, E.J., CINNAMOND, M.J., NICHOLS, P., STANFORD, C.F.:** The effects of diuretics on nasal transmucosal potential difference. *Clin. Otolaryngol.* 17: 351-353 (1992)

**[60] APP, E.M., KING, M., HELFESRIEDER, R., KÖHLER, D., MATTHYS, H.:** Acute and long-term amiloride inhalation in cystic fibrosis lung disease. *Am. Rev. Respir. Dis.* 141: 605-612 (1990)

**[61] KÖHLER, D., APP, E., SCHMITZ-SCHUHMANN, M., WÜRTEMBERGER, G., MATTHYS, H.:** Inhalation of amiloride improves the mucociliary and the cough clearance in patients with cystic fibrosis. *Eur. J. Respir. Dis.* 69: 319-326 (1986)

**[62] LINDEMANN, H., BECKER, T., BITTNER, P., BOLDT, A., HOFMANN, T., SCHWANDT, H.J.:** Sekretelimination bei CF-Patienten unter Amiloridinhalation. *Pneumologie* 44: 1148-1150 (1990)

**[63] COTTON, C.U., STUTTS, M.J., KNOWLES, M. R.:** Abnormal apical cell membrane in cystic fibrosis nasal epithelium. Clin. Res. 33: 463 A (1985)

**[64] ALTER, H., GEIDEL, C., KRAHL, A., HÜLS, G., LINDEMANN, H.:** Moderne elektrophysiologische CF-Diagnostik in vivo. Monatsschr Kinderheilkd 2:166 (1999)

**[65] SCHÜLER, D., MOERKERK, W., ALTER, H., WEBER, K., GEIDEL, C., HÜLS, G., LINDEMANN, H.:** Salbutamol: eine Alternative zu Isoproterenol bei der nasalen transepithelialen Potentialdifferenzmessung mittels Superfusion. Monatsschr. Kinderheilkd. 148: P57 (abstract) (2000)

**[66] FRIZZEL, R.A., RECHKEMMER, G., SHOEMAKER, R.I.:** Altered regulation of airway epithelial cell chloride channels in cystic fibrosis. Science 233: 558-560 (1986)

**[67] KNOWLES, M., CLARKE, L., D.V.M., BOUCHER, R.C.:** Activation by extracellular nucleotides of chloride secretion in the airway epithelia of patients with cystic fibrosis. N. Engl. J. Med. 325: 533-538 (1991)

**[68] MIDDLETON, P.G., GEDDES, D.M., ALTON, E.W.F.W.:** Protocols for in vivo measurement of the ion transport defects in cystic fibrosis nasal epithelium. Eur. Respir. J. 7: 2050-2056 (1994)

**[69] KNOWLES, M., PARADISO, A.M., BOUCHER, R.C.:** In vivo nasal potential difference: techniques and protocol for assessing efficacy of gene transfer in cystic fibrosis. Hum. Gene. Ther. 6: 445-55 (1995)

**[70] ALTON, E.W.F.W., CURRIE, D., LOGAN-SINCLAIR, R., WARNER, J.O., HODSON, M.E., GEDDES, D.M.:** Nasal potential difference: a clinical diagnostic test for cystic fibrosis. Eur. Respir. J. 3: 922-926 (1990)

**[71] SCHÜLER, D., MOERKERK, W., ALTER, H., WEBER, K., GEIDEL, C., HÜLS, G., LINDEMANN, H.:** Vereinfachung der CF-Diagnostik bei der nasalen transepithelialen Potenzialdifferenzmessung mittels Superfusion. Monatsschr. Kinderheilkd. 148: P58 (abstract) (2000)

**[72] GOWEN, C.W. jr, GOWEN, M.A., KNOWLES, M.R.:** Colonic transepithelial potential difference in infants with cystic fibrosis. J. Pediatr. 118: 412-5 (1991)

**[73] ORLANDO, R.C., POWELL, D.W., CROOM, R.D., BERSCHNEIDER, H.M., BOUCHER, R.C., KNOWLES, M.R.:** Colonic and esophageal transepithelial potential difference in cystic fibrosis Gastroenterology 9: 1041-1048 ( 1989 )

**[74] GOLDSTEIN, J.L., SHAPIRO, A.B., RAO, M.C., LAYDEN, T.J.:** In vivo evidence of altered chloride but not potassium secretion in cystic fibrosis rectal mucosa. Gastroenterology 101:1012-1019 (1991)

**[75] GOLDSTEIN, J.L., NASH, N.T., AL-BAZZAZ ,F., LAYDEN ,T.J., RAO, M.C.:** Rectum has abnormal ion transport but normal cAMP-binding proteins in cystic fibrosis. Am. J. Physiol. 254, C7:19-24 (1988)

**[76] PIENKOWSKI, P., FIORAMONTI, J, FREXINOS, J:** Rectal potential differences in irritable bowel syndrome and in inflammatory bowel diseases in man. J. Intern. Med. 226: 423-427 (1989)

**[77] PIENKOWSKI,P., FIORAMONTI , J., SKALLI , F., FREXINOS, J.:** Effects of corticoids, 5-aminosalicylic acid and sucralfate on the potential difference of the rectum in inflammatory colitis in man. *Gastroenterol. Clin. Biol.* 13: 202-207 (1989)

**[78] BUCH, E., HINOJOSA, J., LLEDO, S., BULBENA ,O., NAVARRO, C., FERNANDEZ, C.:** Transmucosal potential difference in experimental colitis in rats. *Inflammation* 19: 445-455 (1995)

**[79] PATTON, C.J., JENKINS, M.Q., BRIGGMAN, J.V., SPICER, S.S.:** Effect of amiloride on potential difference across rectal mucosa in cystic fibrosis patients. *Pediatr. Res.*16: 1035-1036 (1982)

**[80] TEUNE, T.M., TIMMERS-REKER, A.J., BOUQUET, J., BIJMAN, J., DE JONGE, H.R., SINAASAPPEL, M.:** In vivo measurement of chloride and water secretion in the jejunum of cystic fibrosis patients. *Pediatr. Res.* 40: 522-527 (1996)

**[81] WILSCHANSKI, M.A., ROZMAHEL, R., BEHARRY, S., KENT, G., LI. C., TSUI, L.C., DURIE, P., BEAR, C.E.:** In vivo measurements of ion transport in long-living CF mice. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 219: 753-759 (1996)

**[82] SCHÜLER, D., WEBER, K., MOERKERK, W., HÜLS, G., LINDEMANN, H.:** RECTAL MEASUREMENT OF POTENTIAL DIFFERENCE IN INFANTS: a new sensitive tool for routine use in the diagnostic field of cystic fibrosis. *Journal of Cystic Fibrosis, Abstracts of the 24<sup>th</sup> European Cystic Fibrosis Conference* 6-9 June 2001, Vienna Austria, P118



- [83] SCHÜLER, D., W. MOERKERK, K. WEBER, G. HÜLS, H. LINDEMANN:** Diagnostik bei zystischer Fibrose (Mukoviszidose). Atemw.-Lungenkrkh. 30, 28-37 (2004)
- [84]SCHÜLER, D., WEBER, K., MOERKERK, W., HÜLS, G., LINDEMANN, H.:** Stellenwert elektrophysiologischer Mukoviszidose-Diagnostik. Klin. Pädiatr. 215: 107 (abstract) (2003)
- [85] SACHS, L.:** Angewandte Statistik. Springer-Verlag, Berlin, 9. Aufl. (1999)
- [86] DRUMM MITCHELL, L.:** Modifier genes and variations in cystic fibrosis. Resp. Res. 2, 125-128 (2001)
- [87] ACCURSO F.J., SONTAG, M.K.:** Seeking modifier genes in cystic fibrosis. Am. J. Respir. Crit. Care Med. 167, 289 (2003)
- [88] MEKUS ,F., BALLMANN, M., BRONSVELD, I., DORK, T., BIJMAN, J., TUMMLER, B., VEEZE, H.J.:** Cystic-fibrosis-like disease unrelated to the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator. Hum. Genet 102: 582-6 (1998)
- [89] KERSTING, U., SCHWAB, A., HEBESTREIT, A.:** Measurement of human nasal potential difference to teach the theory of transepithelial fluid transport. Am. J. Physiol. 275: 72-77 (1998)
- [90] SCHMIDT, R., THEWS, G.:** Physiologie des Menschen. 26. Aufl., Springer, Berlin, Heidelberg, New York 1995

**[91] MORAN, W.M., VALENTICH, J.D.:** Cl-secretion by cultured shark rectal gland cells. II. Effects of forskolin on cellular electrophysiology. Am. J. Physiol. 260: 824-31 (1990)

**[92] LEVIN, R.J., PARKER A.J.:** Rectal electrogenic secretion - is it a putative indicator of intestinal secretory status induced by nutritional deprivation in the rat? Exp. Physiol. 75: 609-11 (1990)

Teile der Doktorarbeit, die bereits veröffentlicht wurden:

**SCHÜLER, D., WEBER, K., WAGNER, J., HÜLS, G., LINDEMANN, H.:**  
Influence of various flows of superfusion solutions on nasal transmucosal potential difference. Journal of Cystic Fibrosis, Abstracts of the 24<sup>th</sup> European Cystic Fibrosis Conference 6-9 June 2001, Vienna Austria, P9

**SCHÜLER, D., WEBER, K., MOERKERK, W., HÜLS, G., LINDEMANN, H.:**  
Verwendung von direkt konnektierbaren Elektroden bei der Potenzialdifferenzmessung am Menschen. Atemw.-Lungenkrkh. 27: 375-376 (2001)

**SCHÜLER, D., WEBER, K., MOERKERK, W., WAGNER, J., HÜLS, G., LINDEMANN, H.:** Vergleich von rektaler und nasaler Potenzialdifferenzmessung in vivo. Monatsschr. Kinderheilkd. 149: S.194 (2001)

## 8 Danksagung

An erster Stelle möchte ich mich bei meinem Doktorvater Prof. Lindemann bedanken, der mir immer mit Rat und Tat bei allen Fragen und Problemen zur Seite gestanden hat.

Weiterhin gilt mein besonderer Dank allen Mukoviszidose Patienten und Probanden, die sich für Messungen zur Verfügung gestellt haben, und damit diese Arbeit erst möglich gemacht haben.

Bedanken möchte ich mich auch bei meinem Betreuer Daniel Schüler, dem Team der Lungenfunktion (Heike Hinkelthein, Holger Keller, Monika Johnson, Annette Simon und Cordula Mote) und meinen Mit-Doktoranden Wiebke Moerkerk und Juliane Wagner, durch deren Unterstützung die Durchführung der Messungen neben Arbeit auch viel Freude bereitete.

Zuletzt möchte ich mich noch ganz herzlich bei meiner Familie, meinen Eltern, meinem Bruder Sven und meiner Schwester Ulrike bedanken, die mich durch mein Studium begleitet und immer unterstützt haben.

## 9 Lebenslauf

### Persönliche Daten

Name:	Katrin Christina Weber
Geburtsdatum:	19.02.1976
Geburtsort:	Wiesbaden
Staatsangehörigkeit :	deutsch
Familienstand:	ledig
Eltern:	Dr. Joachim Weber, Kinderarzt Dr. Ursula Weber, Kinderärztin
Geschwister:	Sven Christian Weber, Arzt Ulrike Annick Weber, Studentin der Literatur- und Buchwissenschaft

### Ausbildungsdaten

1982-1986	Besuch der Hermann-Löns-Grundschule in Wiesbaden-Bierstadt
1986-1988 Bierstadt	Besuch der Theodor-Fliedner-Schule in Wiesbaden-Bierstadt
1988-1995	Besuch des Leibniz-Gymnasiums in Wiesbaden
Sept. 1992 - März 1993	sechsmonatiger Schüleraustausch in San Francisco
Juni 1995	Abitur
Aug. 1995 - Schmidt - Okt. 1995	Pflegepraktikum in der Kinderklinik der Dr. - Horst – Klinik in Wiesbaden
Okt. 1995	Aufnahme des Studiums der Humanmedizin an der Justus-Liebig-Universität Gießen

Sept. 1997	Ärztliche Vorprüfung
März 1999	Erstes Staatsexamen
April 2001	Zweites Staatsexamen
April 2001	Beginn des Praktischen Jahres
April 2001 - Aug. 2001	Chirurgie am Tygerberg Hospital, University of Stellenbosch, Südafrika
Aug. 2001 - Dez. 2001	Pädiatrie an der Uniklinik Gießen
Dez. 2001 - März 2002	Innere Medizin an der Uniklinik Gießen
Mai 2002	3. Staatsexamen
Nov. 2002 - April 2004	Ärztin im Praktikum in der Pneumologischen Abteilung und der Infektionsstation der Kinderklinik Gießen
seit Mai 2004	Assistenzärztin in der Pneumologischen Abteilung der Kinderklinik Gießen